

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна  
наукова праця  
на правах рукопису

**Огієнко Світлана Леонідівна**

УДК 612.35:612.419]:576.3

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**«ВІК-ЗАЛЕЖНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**  
**КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ У ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ**  
**ЗА РІЗНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СТАНІВ ПЕЧІНКИ»**

Спеціальність 03.00.13 – «Фізіологія людини і тварин»

(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ С. Л. Огієнко

Науковий керівник: Божков Анатолій Іванович, доктор біологічних наук,  
професор

Харків - 2019

## АНОТАЦІЯ

**Огієнко С. Л. Вік – залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за впливу різних функціональних станів печінки –**  
Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальність 03.00.13 – фізіологія людини і тварин (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2019.

Всі існуючі гіпотези в геронтології можуть бути об'єднані в дві концепції – генетичну та епігенетичну. Якщо розглянути їх з позиції сучасних даних, то їх можна об'єднати в єдину – епігенетичну. Розвиток епігенетичної концепції може дати пояснення механізмів старіння як результату темпоральних взаємодій метаболічної системи з динамічно факторами мікрооточення, які змінюються. Однак проблема полягає в тому, що в даний час поки не розроблені методи і підходи, що дозволяють досліджувати особливості впливу факторів мікрооточення на характеристики клітин в системі *in vivo*. Суть проблеми полягає в тому, що мікрооточення тих чи інших типів клітин в організмі є надзвичайно динамічним і є багатокомпонентним. У зв'язку з цим для вирішення цієї важливої та складної проблеми необхідно підібрати вдалі експериментальні моделі. В якості моделі з дослідження впливу особливостей мікрооточення на клітини в онтогенезі в системі організму був обраний кістковий мозок.

Кістковий мозок представлений різними типами клітин, одними з яких є гемо поетичні стовбурові клітини, які диференціюються в кістковому мозку в клітини крові. Швидкість диференціювання та спрямованість (типи клітин, що утворюються) залежать від мікрооточення клітин кісткового мозку. У свою чергу, характеристики мікрооточення є інтегральною характеристикою інших тканин і систем організму. Отже, досліджуючи типи клітин кісткового мозку, а також їх характеристики, можна зрозуміти характер і особливості міжклітинних взаємодій, що є важливою характеристикою вік-залежних патологій. Так,

змінюючи характеристики та спрямованість диференціювання клітин кісткового мозку у тварин різного віку, можна отримати інтегральні характеристики вікових змін, а при моделюванні патологій, зокрема печінки, можна отримати відповідь про взаємозв'язок патологій печінки з функцією кісткового мозку та його ролі в розвитку тих чи інших вік-залежних патологій.

Виходячи з цього, метою дослідження можливого впливу характеру мікрооточення на клітини кісткового мозку, було дослідження морфологічних типів клітин кісткового мозку молодих і старих щурів лінії *Wistar*, вміст в клітинах кісткового мозку іонів кальцію та міді, а також реактивних форм кисню, здатність клітин кісткового мозку до проліферації в системі *in vitro*, які були виділені у молодих і старих тварин. Цей цикл робіт дозволив показати, що у кістковому мозку старих тварин містилося значно більше лімфоцитів, ніж в кістковому мозку молодих тварин. Клітини кісткового мозку старих тварин містили більше іонів кальцію, ніж такі, отримані у молодих тварин. При цьому вміст іонів міді та ROS в клітинах кісткового мозку старих тварин був меншим, ніж в клітинах молодих тварин. Отже, зміна мікрооточення клітин кісткового мозку, яке сформувалося в організмі старих тварин, супроводжувалося зміною фізико-хімічних характеристик клітин кісткового мозку.

Зміна фізико-хімічних характеристик клітин кісткового мозку мала вплив і на їх функціональні особливості. Так, перенесення клітин в первинну культуру показало, що в однакових умовах середовища клітини кісткового мозку, отримані у старих тварин, мали більшу проліферативну активність в порівнянні з клітинами, які були отримані у молодих тварин. Необхідно відзначити, що висока проліферативна активність клітин кісткового мозку в культурі була пов'язана не з тим, що у старих тварин містилася більша кількість лімфоцитів, а швидше за все, з особливостями структурної організації клітин кісткового мозку, так як лімфоцити клітин кісткового мозку в культурі не проліферували.

Для підтвердження ролі впливу мікрооточення на характеристики структури кісткового мозку досліджували роль індукованого фіброзу печінки. Як відомо, фіброз печінки є запальною реакцією, яка супроводжується зміною у

вмісті цитокінів та інших регуляторних молекул в крові, що має регуляторний вплив на характеристики мікрооточення клітин кісткового мозку. Показали, що така зміна мікрооточення викликана змінами фізико-хімічними характеристиками клітин кісткового мозку і зміною спрямованості диференціювання клітин, судячи за патерном морфотипів клітин кісткового мозку, який змінився. При цьому клітини кісткового мозку, які були виділені у тварин з фіброзом печінки, відрізнялися за їхньою здатністю до проліферації в культурі і за «тривалістю життя» клітин в культурі.

На користь впливу особливостей мікрооточення на характеристики клітин кісткового мозку свідчать також дані про різний вплив на ці показники Cu-індукованого та CCl<sub>4</sub>-індукованого фіброзів печінки. Відомо, що під час цих дії різних індукторів фіброзу по-різному змінюється спектр і вміст цитокінів. Важливим є той факт, що на модуляцію «поведінки» клітин кісткового мозку велику роль має вік тварин. У наших роботах мав місце вік-залежний характер відповіді на поведінку клітин кісткового мозку. Отримані результати дозволили дійти висновку, що важливим фактором у формуванні відповіді клітин на зміну мікрооточення є вихідний структурно-функціональний стан. Основним фактором у формуванні початкового стану є вік тварини. Або, іншими словами, відповідь клітин кісткового мозку на зміну мікрооточення, яка може бути викликана індукцією патології або зміною функціональних характеристик в інших органах, буде залежати не тільки від них, але й від вихідного стану клітин в момент зміни мікрооточення. На користь цього свідчать дані про зміну проліферативної активності клітин кісткового мозку, отриманих у молодих і старих тварин після внесення в культуру *in vitro* 4 і 8 мМ CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O. Було виявлено, що в культурі клітин екзогенна мідь інгібувала активність клітин кісткового мозку молодих тварин, при чому була виявлена пряма дозова залежність, тобто чим більше концентрація іонів міді, тим вище ефект інгібування проліферативної активності клітин кісткового мозку.

У той же час внесення екзогенних іонів міді в культуру клітин кісткового мозку старих тварин, які відрізнялися на початку культивування від клітин

молодих тварин за фізико-хімічними характеристиками, не інгібували проліферативну активність клітин кісткового мозку молодих тварин, і мала місце не пряма, а зворотня дозова залежність, тобто більша доза (8 мМ) надавала менший ефект гальмування проліферативної активності, ніж мала доза (4 мМ). Звичайно, дослідження механізмів таких ефектів вимагає додаткових експериментів, але вже це дає підстави стверджувати про важливість мікрооточення клітин, які залежать від віку.

Важливим етапом роботи стало дослідження можливостей регулювання стану мікрооточення після індукції фіброзу печінки так, щоб забезпечити нормалізацію та підтримку функції клітин кісткового мозку на рівні інтактних тварин. Такий підхід дозволить визначити роль клітин кісткового мозку в усуненні патології печінки. Вирішення цього питання має велике практичне значення. Відомо, що в разі фіброзу або цирозу печінки мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку здатні мігрувати в печінку, де беруть участь в регенерації цього органу. Можна вважати, що сигналом для індукції транспорту незрілих клітин до кровотока є компоненти мікрооточення.

Була висловлена робоча гіпотеза, згідно з якою компоненти молозива можуть служити такими сигналами мікрооточення клітин кісткового мозку, які можуть моделювати його функції. З метою перевірки гіпотези експериментальним тваринам з Cu-індукованим фіброзом трикратно з інтервалом в 24 години вводили низькомолекулярні компоненти молозива в дозі 0,1 мг на 100 г маси тіла. Раніше було показано, що така доза і схема введення забезпечувала відновлення цілого ряду функціональних характеристик печінки і відновлювала фізіологічні показники у тварин до рівня контролю. У даній роботі було показано, що компоненти молозива частково відновлювали клітинний склад в кістковому мозку у тварин з фіброзом печінки, а клітини кісткового мозку, переведені в культуру, відновлювали свій проліферативний потенціал до рівня контролю в порівнянні з втратою проліферативної активності у тварин з фіброзом печінки. Ці результати дозволяють зробити висновок, що низькомолекулярні компоненти молозива можуть бути використані як чинники

регуляції мікрооточення клітин кісткового мозку в разі патології печінки. Отримані результати підтверджують отримані раніше дані про роль клітин кісткового мозку регуляції функції печінки при фіброзі.

Отже, можна зробити висновок, що мікрооточення, яке було змінено індукованим фіброзом печінки та віком тварин, впливало на характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі. Виявлено, що характеристики клітин кісткового мозку (вміст іонів кальцію, іонів міді, вільних форм кисню; здатність до проліферації та «тривалість життя» у первинній культурі, співвідношення морфологічно ідентифікованих/неідентифікованих типів клітин) залежить не від віку як такого, а від характеристик мікрооточення клітин кісткового мозку, яке моделюється функціональним станом печінки та біологічно активними сполуками, такими як, низькомолекулярні компоненти молозива.

**Ключові слова:** кістковий мозок, старіння, стовбурові клітини, мікрооточення, фіброз печінки, біологічно активні речовини.

## ABSTRACT

***Ohienko S. L. Age – determined characteristics of bone marrow cells in the primary culture under different functional liver conditions.*** – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology: Speciality 03.00.13 – Human and Animal Physiology (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

All existing hypotheses in gerontology can be combined into two concepts - genetic and epigenetic, and the latter to be regarded as a single one considering contemporary data. Development of the epigenetic concept can clarify mechanisms of ageing as a result of temporal interactions of the metabolic system with factors of microenvironment, which change dynamically. However, the problem is currently that methods and approaches have not yet been developed to allow studying the features of

the influence of factors of microenvironment on the characteristics of cells in the in vivo system. The essence of the problem is that the microenvironment of certain types of cells in the body is extremely dynamic and multi-component. In this regard, this important and complex problem to be solved, it is necessary to select appropriate experimental models. Bone marrow was chosen as a model in the study of the influence of microenvironment features on cells in ontogenesis in the body system.

The bone marrow is represented by different types of cells - stem cells, which differentiate in the bone marrow into blood cells. The rate of differentiation and orientation (types of cells formed) depend on the microenvironment of bone marrow cells. In turn, the characteristics of the microenvironment are an integral characteristic of other tissues and systems of the body. Therefore, by studying the types of bone marrow cells and their characteristics, one can understand the nature and characteristics of intercellular interactions, which is an important age-dependent characteristic.

Thus, by changing the characteristics and orientation of the differentiation of bone marrow cells in animals of different ages, one can obtain integral characteristics of age-related changes, and when modeling pathologies, in particular the liver, one can get an answer about the relationship of liver pathologies with bone marrow function and its role in the development of certain age-dependent pathologies.

Based on this, the aim of the study of possible influence of the nature of the microenvironment on bone marrow cells is to study the morphological types of bone marrow cells of young and old Wistar rats, the contents of calcium and copper ions in bone marrow cells, as well as reactive oxygen species, and the ability of bone marrow cells to proliferate in in vitro system, which are isolated from young and old animals. This cycle of works allowed to show that the bone marrow of old animals contained significantly more lymphocytes than the bone marrow of young animals. The bone marrow cells of old animals contained more calcium ions than those obtained in young animals, while the content of copper and ROS ions in the bone marrow cells of old animals was less than in cells of young animals. Therefore, a change in the microenvironment of bone marrow cells, which was formed in the body of old animals, was accompanied by a change in the physicochemical characteristics of bone marrow

cells. A change in the physicochemical characteristics of bone marrow cells also influenced their functional characteristics. Thus, the transfer of cells to primary culture showed that, under the same environmental conditions, bone marrow cells obtained in old animals had greater proliferative activity compared with cells obtained in young animals. It should be noted that the greater proliferative activity of bone marrow cells in the culture was not due to the fact that older animals contained a larger number of lymphocytes, but most likely to the structural organization of bone marrow cells, since the bone marrow cells did not proliferate in the culture.

To confirm the role of the influence of the microenvironment on the characteristics of the bone marrow structure, the role of liver fibrosis was studied. As you know, liver fibrosis is an inflammatory reaction, accompanied by a change in the content of cytokines and other regulatory molecules in the blood, which has a regulatory effect on the characteristics of the microenvironment of bone marrow cells. It was shown that such a change in the microenvironment is caused by changes in the physicochemical characteristics of bone marrow cells and a change in the direction of cell differentiation, judging by the changed pattern of bone marrow cell morphotypes. Moreover, the bone marrow cells that were isolated in animals with liver fibrosis differed in their ability to proliferate in culture and in the “life expectancy” of cells in culture.

Evidence in favor of the influence of the microenvironment features on the characteristics of bone marrow cells is also evidenced by the different effects on these indicators of Cu-induced and CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis. It is known that with these different fibrosis inducers, the spectrum and content of cytokines varies in different ways. Important is the fact that age plays an important role in modulating the “behavior” of bone marrow cells. In our work was observed age-dependent nature of the response to the behavior of bone marrow cells. The results obtained allowed us to conclude that the initial structural and functional state is an important factor in the formation of cell response to a change in microenvironment. The main factor in the formation of the initial state is the age of the animal. In other words, the response of bone marrow cells to a change in the microenvironment, which may be caused by the



induction of pathology or a change in functional characteristics in other organs, will depend not only on it, but also on the initial state of the cells at the time of the change in the microenvironment. This is supported by data on changes in the proliferative activity of bone marrow cells obtained in young and old animals after 4 and 8 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  were introduced into the culture in vitro. It was found that exogenous copper inhibited the proliferative activity of cells of young animals, and there was a direct dose dependence, i.e. the higher is the concentration of copper ions, the higher is the effect of inhibiting proliferative activity.

At the same time, the introduction of exogenous copper ions into the bone marrow cell culture of old animals, which initially differed from the cells of young animals in physicochemical characteristics, did not inhibit the proliferative active bone marrow cells of young animals, and there was not a direct but an inverse dose dependence, that is, a larger dose (8 mM) had a lesser effect of inhibition of proliferative activity than a small dose (4 mM). Certainly, the study of the mechanisms of such effects requires additional experiments, but already this allows us to assert the importance of the microenvironment of cells, which depend on age.

An important stage of the work was the study of the possibilities of regulating the state of the microenvironment after induction of liver fibrosis so as to ensure normalization and maintenance of bone marrow cell function at the level of intact animals. This approach will determine the role of bone marrow cells in the elimination of liver pathology.

The solution to this issue is of great practical importance. It is known that in case of liver fibrosis or cirrhosis, bone marrow mesenchymal stem cells are able to migrate to the liver, where they participate in the regeneration of this organ. It can be assumed that the components of the microenvironment are a signal for inducing the transport of immature cells into the bloodstream. A working hypothesis was put forward, according to which the components of colostrum can serve as signals of the microenvironment of bone marrow cells that can simulate its function. To test the hypothesis, experimental animals with Cu-induced fibrosis were injected with low molecular weight colostrum components at a dose of 0.1 mg per 100 g of body weight three times with an interval

of 24 hours. It was previously shown that such a dose and administration scheme provided restoration of a number of functional characteristics of the liver and restored physiological parameters in animals to the control level. In the present work, it was shown that the components of colostrum partially restored the cellular composition in the bone marrow in animals with liver fibrosis, and bone marrow cells transferred to the culture restored their proliferative potential to the control level compared with the loss of proliferative activity in animals with liver fibrosis. These results allow us to conclude that the low molecular weight components of colostrum can be used as factors in the regulation of the microenvironment of bone marrow cells in the case of liver pathology. These results confirm previously obtained data on the role of bone marrow cells in the regulation of liver function in fibrosis.

Based on this, it can be concluded that the microenvironment, which was altered by induced liver fibrosis and the age of the animals, affected the characteristics of bone marrow cells in primary culture. It was found that the characteristics of bone marrow cells (the content of calcium ions, copper ions, free oxygen species, the ability to proliferate and “life expectancy” in primary culture, the ratio of morphologically identifiable / unidentified cell types) does not depend on age as such, but on the characteristics of the microenvironment bone marrow cells, which is modeled by the functional state of the liver and biologically active compounds, such as low molecular weight components of colostrum.

**Key words:** bone marrow, aging, stem cells, microenvironment, liver fibrosis, biologically active compounds.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Наукові праці у зарубіжних наукових фахових виданнях:*

1. Божков А. И., **Огиенко С. Л.**, Бондарь А. Ю., Климова Е. М., Иванов Е. Г. Фиброз печени, индуцированный у молодых и старых животных, сопровождается возрастзависимыми изменениями в клетках костного мозга // Успехи геронтологии. 2019. Т. 32, № 1-2. С. 45-54. (Перевидана в: Bozhkov A. I., **Ohiienko S. L.**, Bondar A. Yu., Klimova E. M., Ivanov E. G. Liver-induced fibrosis in young and old animals is accompanied by age-dependent changes in bone marrow cells // Advances in Gerontology. 2019. Vol. 32, N 1-2. P. 45-54. (SCOPUS, PubMed, Crossref, GoogleScholar). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

2. **Ohiienko S. L.**, Bondar A. Yu., Ivanov E. G., Bozhkov A. I. Liver fibrosis has a different effect on the “lifespan” of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats // MOJ Gerontol Ger. 2019. Vol. 4. N 1. P. 36-40. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

3. **Ohiienko S. L.**, Bozhkov A. I., Bondar A. Yu., Ivanov E. G., Ionov I. A. Bone marrow cells obtained from old animals differ from the young animals cells in their ability to divide and in response to the presence of liver fibrosis in primary culture // Advances in Aging Research. 2019. Vol. 8. P. 14-27. (Crossref, GoogleScholar). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

4. Bozhkov A. I., **Ohiienko S. L.**, Kuznetsova Y. A., Bondar A. Y., Marchenko V. P., Gumennaya M. S. Donor age affects behavior and sensibility of bone marrow cells to copper ions in primary culture // Advances in Gerontology. 2017.

Vol. 7, N 4. P. 336-344. (SCOPUS, PubMed, Crossref, GoogleScholar). (Перевидана в: Божков А. И., **Огиенко С. Л.**, Кузнецова Ю. А., Бондарь А. Ю., Марченко В. П., Гуменная М. С. Возраст донора влияет на «поведение» и чувствительность клеток костного мозга к ионам меди в первичной культуре // Успехи геронтологии. 2017. Т. 30, № 3. С. 457-467). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

**5.** Anatoliy I. Bozhkov, Eugeniy G. Ivanov, Yuliya A. Kuznetsova, **Svetlana L. Ohienko**, Anastasiya Yu. Bondar. Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture // Frontiers in Biology. 2017. Vol. 12, N 4. P. 271-279. (SCOPUS, Crossref, GoogleScholar) *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

*Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації*

**6.** **Ohienko S. L.**, Bondar' A. Yu., Ivanov E. G. Induced liver fibrosis influence on the bone marrow cells culture of rats' different ages // The development of nature sciences: problems and solutions: The international research and practical conference, 27-28 apr. 2018.: abstr. Brno, 2018. P. 64-66. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

**7.** **Ohienko S.**, Bondar A., Ivanov E. Assessment of cytotoxic action of bovine's colostrum low-molecular-weight components on bone marrow cells' culture // Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts: XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, 10-12 apr. 2018.: abstr. Lviv, 2018. P. 267-268. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів,*

написання тез).

**8. Ohiienko S. L., Bondar' A. Yu.** Bone marrow cells behavior in the primary culture under influence of  $\text{CCl}_4$  – induced liver fibrosis // Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances: XV International Scientific Conference of Students and Young Scientists, 18-21 apr. 2017.: abstr. Kyiv, 2017. P. 153-154. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

**9. Ohiienko S. L., Bondar' A. Yu., Gumennaya M. S., Marchenko V. P.** Age affects the “behavior” and the sensibility to copper ion of animals’ bone marrow cells in the primary culture // Youth and progress of biology: XIII international scientific conference for students and PhD students, 25-27 apr. 2017.: abstr. Lviv, 2017. P. 245-246. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

**10. Ohiienko S. L., Bondar' A. Yu.** Influence of anabaena flos-aquae extract on the bone marrow primary culture of young rats // Biology: from a molecule up to the biosphere»: 12th International young scientists’ conference, 29 nov.-1 dec. 2017.: abstr. Kharkiv, 2017. P. 38. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

**11. Ohiienko S. L., Kuznetsova Y. A., Bondar A. Yu.** Colostrum low molecular components affects the primary culture of bone marrow cells // Shevchenkivska Vesna: Biology: XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students and Young Scientists, 6 – 8 apr. 2016.: abstr. Kyiv, 2016. P. 16-17. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ КІСТКОВОГО МОЗКУ В ОНТОГЕНЕЗІ ТА ЗА ВПЛИВУ ПАТОЛОГІЙ ПЕЧІНКИ (літературний огляд).....	25
1.1 Характеристика кісткового мозку (локалізація, кількісні зміни в процесі старіння та патологій).....	25
1.1.1 Вплив віку на клітини кісткового мозку.....	27
1.1.2 Роль клітин кісткового мозку в розвитку патологій печінки.....	32
1.1.3 Кістковий мозок – депо стовбурових клітин, їх особливості та здатність до диференціювання.....	37
1.1.4 Вплив окислювального стресу на швидкість та проліферацію клітин кісткового мозку.....	43
1.2 Мікрооточення та його вплив на функції та проліферацію клітин кісткового мозку.....	43
Висновки до розділу 1.....	46
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	48
2.1 Характеристика об'єкта дослідження.....	48
2.2 Моделювання Cu – індукованого та CCl <sub>4</sub> – індукованого фіброзу печінки.....	49
2.3 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на первинну культуру клітин кісткового мозку.....	50
2.4 Виділення клітин кісткового мозку.....	50
2.5 Культивування клітин кісткового мозку.....	52
2.6 Дослідження «поведінки» клітин кісткового мозку при внесенні у культури сірчаноокислої міді.....	52

2.7	Визначення кількості клітин та їх морфотипів.....	53
2.8	Визначення «тривалості життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі.....	54
2.9	Визначення іонів кальцію у клітинах кісткового мозку.....	54
2.10	Визначення іонів вільних форм кисню у клітинах кісткового мозку (ROS).....	54
2.11	Визначення вмісту іонів міді у клітинах кісткового мозку.....	56
2.12	Статистична обробка результатів дослідження.....	56
	Висновки до розділу 2.....	57
	<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.....</b>	<b>58</b>
3.1	Дослідження вік-залежних змін характеристик клітин кісткового мозку щурів у первинній культурі.....	58
3.1.1	Дослідження інтенсивності росту та патерну морфотипів первинних культур клітин кісткового мозку молодих і старих тварин.....	58
3.1.2	Дослідження «тривалості життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі з 0 до 96 години культивування.....	61
3.1.3	Дослідження деяких характеристик іонного складу та редокс-системи клітин кісткового мозку молодих та старих інтактних тварин.....	64
3.2	Дослідження вік-залежних характеристик клітин кісткового мозку в первинній культурі у тварин з індукованим фіброзом печінки (Cu– та CCl <sub>4</sub> –).....	67
3.2.1	Дослідження деяких особливостей CCl <sub>4</sub> –індукованого та Cu–індукованого фіброзу печінки.....	67
3.2.2	Дослідження паттерну морфотипів клітин кісткового мозку, отриманих у тварин з фіброзом печінки, в системі <i>in vivo</i> .....	73
3.2.3	Дослідження «тривалості життя» лімфоцитів, нейтрофілів та матемієлоцитів, отриманих з кісткового мозку молодих та старих інтактних тварин та тварин з фіброзом печінки, у первинній культурі з 0 по 96	

годину.....	76
3.2.4 Дослідження впливу індукованого фіброзу печінки на інтенсивність росту клітин кісткового мозку у первинній культурі.....	81
3.2.5 Дослідження впливу іонів екзогенної міді на інтенсивність росту культур клітин кісткового мозку молодих та старих тварин, та тварин з фіброзом печінки.....	83
3.3 Дослідження впливу вік–залежного впливу комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на деякі характеристики клітин кісткового мозку з Cu–індукованим фіброзом печінки.....	88
3.3.1 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на патерн морфотипів клітин кісткового мозку.....	88
3.3.2 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на «тривалість життя» лімфоцитів в культурі <i>in vitro</i> .....	91
3.3.3 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на «тривалість життя» нейтрофілів в культурі <i>in vitro</i> .....	93
3.3.4 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на зміну кількості клітин кісткового мозку у первинній культурі.....	97
3.3.5 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на характеристики клітин кісткового мозку інтактних тварин.....	99
3.3.5.1 Дослідження впливу різних доз низькомолекулярних компонентів молозива, які вводили тваринам <i>per os</i> , на кількість клітин кісткового мозку з 1 по 4 добу культивування в системі <i>in vitro</i> .....	99
3.3.5.2 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на «тривалість життя» еозинофілів в культурі <i>in vitro</i> .....	102
3.3.5.3 Дослідження впливу різних доз низькомолекулярних компонентів молозива на патерн клітин кісткового мозку.....	103
3.4 Можливий взаємозв'язок йонного складу клітин кісткового мозку, отриманих у тварин різного віку, з їх проліферативною активністю.....	106



3.4.1 Деякі характеристики йонного складу та редокс-системи клітин кісткового мозку молодих і старих тварин після інтоксикації сірчаною кислотою (індукція адаптивної відповіді).....	106
3.4.2 Деякі характеристики йонного складу та редокс-системи клітин кісткового мозку молодих і старих тварин після інтоксикації сірчаною кислотою (індукція адаптивної відповіді).....	110
Висновки до розділу 3.....	117
ВИСНОВКИ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	122
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	146
ДОДАТОК 2 Акт впровадження.....	149
ДОДАТОК 3 Акт впровадження.....	150

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

CSF – спинномозкова рідина

HGF – фактор росту гепатоцитів

IL – імуноглобулін

MMPs – металопротеїнази матриксу

NGF – фактор росту нервів

SDF – стромальний клітинний фактор

TGF – трансформуючий фактор росту

TNF – фактор некрозу пухлини

VEGF – васкулярний ендотеліальний фактор росту

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Більшість трактувань старіння явища зводиться до того, що це – дегенеративний процес, який визначається втратою надійності функціонування біологічних систем і, як наслідок, підвищенням «уразливості» від різноманітних екзогенних факторів, що призводить до розвитку патологій та смерті [1,2].

У спробах пояснити можливі механізми старіння, було висловлено велику кількість мономеханістичних гіпотез. Прикладом можуть служити теломеразна гіпотеза старіння, вільно-радикальна гіпотеза та інші [3,4]. Однак, все різноманіття уявлень існуючих гіпотез може бути об'єднано в дві концепції: генетичну та середову, а точніше єдину епігенетичну концепцію.

Ми вважаємо, що епігенетична концепція може дати пояснення механізмів старіння як результату темпоральних взаємодій метаболічної системи з мінливими факторами мікрооточення (середовища). Існуючі методи генетичних і молекулярно-біологічних методів дослідження не завжди дозволяють класифікувати та пояснити фізіологічні прояви адаптивних або патологічних реакцій організму. Це пов'язано з багаторівневістю регуляції біологічних процесів, наявністю альтернативних варіантів формування біологічної відповіді та, поки, мало вивченими механізмами інтеграційних взаємодій метаболічних процесів до єдиної фізіологічної відповіді [2]. Як відомо, найбільш ефективним методологічним прийомом пізнання є розробка і створення експериментальних моделей. Вони дозволяють не тільки досліджувати явища, але і перевіряти істинність висловлених гіпотез і дати прогноз поведінки систем в заданих умовах [5].

У зв'язку з цим, розробка експериментальних моделей, що дозволяють досліджувати механізми взаємодій метаболізму з комплексом факторів мікрооточення, може бути корисною у вирішенні глобальної проблеми – старінні та інших фізіологічних процесів. З огляду на багаторівневість регуляції та наявність альтернативних шляхів метаболізму для вирішення завдань

геронтології, найбільш адекватними можуть бути клітинні моделі. Ми вважаємо, що вдалою клітинною моделлю вік-залежних механізмів відгуку метаболічної системи на фактори мікрооточення можуть бути клітини кісткового мозку.

По-перше, кістковий мозок представлений різними типами клітин – стовбуровими клітинами, з високим проліферативним і диференційованим потенціалом; біпотентними клітинами попередниками (комітовані клітини); уніпотентними клітинами попередниками та зрілими клітинами лімфоїдної та кровотворної системи [6]. В теперішній час сформувалося уявлення щодо провідної ролі стовбурових клітин у вік-залежній втраті здатності організму до адаптації як результату «втрати» пула стовбурових клітин, в тому числі, кісткового мозку. У зв'язку з цим, актуальним є дослідження проліферативної активності клітин кісткового мозку.

По-друге, функціональна активність (інтенсивність проліферації та спрямованість диференціювання клітин кісткового мозку) змінюється у відповідь на патологічні та адаптивні зміни інших систем організму, тобто вони активно реагують на мікрооточення, що формується в самому організмі [7], що дозволяє дослідити в організмі взаємовідносини між тканинами.

По-третє, клітини кісткового мозку можна виділити та культивувати в системі *in vitro*. І, нарешті, показано, що в клітинах кісткового мозку старих тварин виявляються генетичні та епігенетичні зміни, які ведуть до зниження швидкості проліферації, вкорочення теломер, підвищенню продуктів вільнорадикальних реакцій і ін., тобто мають місце вік-залежні зміни на клітинному рівні [8,9].

Отже, первинні культури клітин кісткового мозку, які отримані у молодих та старих тварин, можуть бути адекватною моделлю у вивченні взаємного впливу та інтеграції різних метаболічних процесів у ході старіння. Одним з підходів у зміні мікрооточення клітин кісткового мозку в системі *in vivo* є зміна функцій печінки. Для того, щоб моделювати функціональну активність печінки, нами були використані кілька підходів: 1–індукція фіброзу печінки багаторазовим введенням сірчаноокислої міді (Cu – індукований фіброз печінки);

2–індукція фіброзу печінки багаторазовим введенням чотирьоххлористого вуглецю ( $\text{CCl}_4$  – індукований фіброз печінки); 3–вплив біологічно активних сполук (низькомолекулярні компоненти молозива) на функціональні характеристики печінки; 4–різний вік тварин (молоді і старі).

**Мета і завдання дослідження.** Метою цієї роботи було дослідити вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на певні характеристики клітин кісткового мозку (вміст кальцію, міді, реактивних форм кисню), їх здібність до проліферації, «тривалість життя» клітин в культурі на моделях: старіння організму, наявність фіброзу печінки, дія низькомолекулярних компонентів молозива.

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Оцінити проліферативну активність клітин кісткового мозку, отриманих у молодих та старих тварин, у первинній культурі з 1 по 4 добу культивування.
  2. Виявити вплив  $\text{Cu}$ –індукованого фіброзу печінки та  $\text{CCl}_4$ –індукованого фіброзу печінки на проліферативну активність та «тривалість життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі.
  3. Охарактеризувати вплив індукованих фіброзів печінки на «тривалість життя» лімфоцитів.
  4. Проаналізувати вплив концентрацій екзогенних іонів міді на інтенсивність росту клітин кісткового мозку, виділених з тварин різного віку в нормі та за умов  $\text{Cu}$ – та  $\text{CCl}_4$ –індукованого фіброзу печінки, у первинній культурі.
  5. Дослідити вплив комплексу низькомолекулярних компонентів молозива на інтенсивність росту клітинних клітин кісткового мозку, виділених з тварин різного віку в нормі та за умов  $\text{Cu}$ –індукованого фіброзу печінки
  6. Оцінити вік – залежний вплив  $\text{Cu}$ –індукованого фіброзу печінки на вміст іонів  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  та вільних форм кисню.
- *об'єкт дослідження* – показники поведінки клітин кісткового мозку у первинній культурі, які були отримані у тварин різного віку та за умов

інтоксикації тварин, а також за застосування низькомолекулярних компонентів молозива.

- *предмет дослідження* – вік – залежні зміни проліферативної активності характеристик морфотипів клітин кісткового мозку у первинній культурі за умов інтоксикації тварин та за застосування низькомолекулярних компонентів молозива.

**Методи дослідження.** Фізіологічні методи дослідження (оцінка нативності плазматичної мембрани клітин кісткового мозку, визначення вмісту іонів кальцію та реактивних форм кисню у клітинах кісткового мозку, культивування клітин кісткового мозку); препаративні (отримання культури клітин кісткового мозку); цитологічні (визначення кількості та морфотипів клітин кісткового мозку); спектрофотометричні (визначення вмісту іонів міді). Бази даних було сформовано в Microsoft Office Excel 2010.

Статистичну обробку даних здійснювали з використанням методу непараметричної статистики (Манні – Уїтні) за допомогою цього ж програмного пакету, а також програмного пакету Statistica 8.0 фірми StatSoft. Графічну візуалізацію отриманих результатів виконували у програмах Origin 8.5.1 фірми OriginLab Corporation та Apache OpenOffice.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше показано, що проліферативний потенціал клітин кісткового мозку не зменшується з віком. Клітини кісткового мозку, що отримані у старих (20 міс.) тварин перебільшували проліферативну активність клітин кісткового мозку, отриманих у молодих (3 міс.) тварин у первинній культурі.

Уперше показано, що у кістковому мозку старих тварин міститься на 28 % морфологічно неідентифікованих морфотипів клітин (стовбурових та недиференційованих до кінця) у порівнянні з молодими тваринами, а співвідношення між морфологічно ідентифікованими типами змінювалась незначно. У кістковому мозку старих тварин містилося в 2,8 рази більша кількість лімфоцитів порівняно з молодими тваринами.

Уперше показано, що розвиток фіброзу печінки мав виражений вплив на

характеристики клітин кісткового мозку. Ці зміни залежали від віку тварин та індуктора фіброзу (сірчаноокислої міді або чотирьоххлористого вуглецю). Так, Cu – індукований фіброз печінки супроводжується пригніченням швидкості росту клітин у первинній культурі, отриманих у молодих тварин, у той час, як клітин кісткового мозку, отримані у старих тварин та переведені у первинну культуру, зберігали проліферативну активність, на відміну від молодих тварин, хоча відставали від контролю.

ССL<sub>4</sub> – індукований фіброз печінки викликав іншу вік-залежну відповідь на рівні клітин кісткового мозку. Якщо клітини кісткового мозку були виділені у молодих тварин з ССL<sub>4</sub> – індукований фіброз печінки, то вони не відрізнялися за проліферативною активністю від контролю. У той же час, якщо клітини кісткового мозку були виділені у старих тварин з ССL<sub>4</sub> – індукований фіброз печінки, то їх проліферативна активність не відрізнялася від контролю.

Уперше показано, що вікові характеристики клітин кісткового мозку, які сформувалися, впливає на наступну відповідь клітин кісткового мозку до дії сірчаноокислої міді. Внесення 4 мМ та 8 мМ сірчаноокислої міді до культури клітин кісткового мозку молодих тварин супроводжувалась дозо-залежним характером інгібування проліферативної активності. У культурі клітин кісткового мозку старих тварин мала місце зворотна дозова залежність, як для інтактних, так і для тварин з фіброзом печінки.

Уперше показано, що біологічно активні сполуки – низькомолекулярні компоненти молозива можуть відновлювати характеристики клітин кісткового мозку за впливу Cu – індукованого фіброзу печінки.

Уперше показано взаємозв'язок між вмістом іонів міді, кальцію, вільних форм кисню та проліферативною активністю клітин кісткового мозку. На вміст іонів міді, кальцію, вільних форм кисню впливав вік тварин та стан печінки цих тварин.

**Біоетична експертиза.** Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших

наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних законів України. Біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 5 від 16 травня 2019 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертації, виконано експериментальні дослідження, проведено статистичні розрахунки, написано та оформлено розділи дисертації. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д.б.н., проф., директором НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Божковим А. І.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертації були представлені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів: XIV International scientific conference of students, PhD students & young scientists “Shevchenkivska vesna: Biology” (Kyiv, 2016); XV International conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: bioscience advances” (Kyiv, 2017); XIII International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology” (Lviv, 2017); XII International young scientists’ conference “Biology: from a molecule up to the biosphere” (Kharkiv, 2017); XIV international scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology” dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski (Lviv, 2018); The international research and practical conference “The development of nature sciences: problems and solutions” (Brno, 2018).

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 150 сторінок, з них основного тексту 110 сторінок. Робота ілюстрована 30 рисунками. Список використаних джерел містить 224 найменування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційні наукові дослідження проводились протягом 2015 – 2018 років у НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна



згідно планів НДР № 0115U000502 «Отримання, скринінг та оцінка антитоксичних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікроводоростей» (здобувач – виконавець); НДР № 0115U000486 «Розробка теорії експериментальної регуляції тривалості онтогенезу» (здобувач – виконавець).

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати роботи показали, що низькомолекулярні компоненти молозива можуть відновлювати характеристики клітин кісткового мозку за індукованих патологічних станів печінки, та можуть бути основою для подальшої розробки фармакологічних препаратів, що впливають на імуногенез клітин кісткового мозку. В теперішній час, ці роботи продовжуються в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в рамках держбюджетної теми з Фермерським господарством «Альфа».

Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці практичних робіт з дисциплін «Клітинні технології» для студентів біологічного факультету, які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні освіти кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

## РОЗДІЛ 1

# СТРУКТУРНО – ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ КІСТКОВОГО МОЗКУ В ОНТОГЕНЕЗІ ТА ЗА ВПЛИВУ ПАТОЛОГІЙ ПЕЧІНКИ (літературний огляд)

### 1.1 Характеристика кісткового мозку (локалізація, кількісні зміни в процесі старіння та патологій)

Кістковий мозок складається зі строми та паренхіми, якою є, власне, гемопоетична тканина. У паренхімі клітини розташовуються ростками: еритропоетичним, гранулоцитопоетичним, лімфопоетичним, моноцитарним та тромбоцитопоетичним. Спільними попередниками всіх клітин крові є плюрипотентні стовбурові клітини, які при дозріванні та диференціюванні дають початок одному з клітинних типів [10, 11].

Напрямок диференціювання ранніх попередників залежить від впливу їх мікрооточення, а також від впливу стромальних клітин кісткового мозку. До стромальних клітин кісткового мозку належать: фібробласти, адипоцити, ендотеліальні та епітеліальні клітини, а також клітини, що є подібними до гладеньких м'язових клітин. Стромальні клітини контролюють гемопоез або шляхом прямих контактів з клітинами – попередниками, або через продукцію та секрецію цитокінів. Цитокіни можуть впливати на вибір шляху диференціювання або забезпечувати сигналами стимуляції для диференціювання за зворотнім шляхом. Дія окремих цитокінів на клітини – попередники в умовах *in vitro* досягається шляхом стимуляції росту окремих колоній з лейкоцитів певного типу. Звідси їх назва – колонієстимулюючі фактори: GM – CSF, G – CSF, M – CSF [12]. Було показано, що гранулоцитарно – моноцитарний чинник стимулює проліферацію ранніх клітин – попередників мієло – моноцитопоезу. Гранулоцитарний та моноцитарний чинники

стимулюють клітини – попередники кожного з ростків [13, 14]. Ще більш універсальним є, так званий, мульти – CSF, який стимулює всі ростки кровотворення [15].

Продуцентами ростових факторів та інших цитокінів є стромальні клітини кісткового мозку, макрофаги та активовані лімфоцити. Інтерлейкін – 1 і інтерлейкін – 6 виступають синергістами колонієстимулюючих факторів в стимуляції проліферації клітин – попередників або індукують продукцію ростових факторів. Разом з цим, макрофаги та лімфоцити продукують ряд цитокінів, що пригнічують процеси проліферації і диференціювання клітин – попередників. До таких цитокінів з інгібуючою дією відносяться: туморнекротизуючий фактор, інтерферон – гамма, що трансформує ростовий фактор [16, 17].

Очевидно, що частина цитокінів продукується в кістковому мозку постійно та приймає участь в регуляції функцій кісткового мозку за нормальних умов. Інша частина цитокінів продукується у відповідь на індукцію для цілеспрямованого посилення продукції тих лейкоцитів, які необхідні для заміщення клітин, що були мобілізовані в процесі запалення, інфекції або пухлинного росту. Таким чином, основною функцією кісткового мозку є продукція всіх клітин, що беруть участь як в неспецифічному захисті організму, так і в специфічній імунній відповіді. При цьому частина клітин кісткового мозку приймає участь в продукції молекул – цитокінів, які регулюють гемопоез [18, 19].

Окрім кровотворення, у ссавців кістковий мозок виконує додаткову функцію, оскільки є місцем дозрівання В – лімфоцитів. Стовбурові клітини можуть диференціюватися в напрямку попередника лімфоцитів, який може дати початок попередникам В – лімфоцитів, попередникам Т – лімфоцитів, а також попередникам природних кілерів [18]. Один з продуктів стромальних клітин кісткового мозку – інтерлейкін 7 – стимулює, переважно, процес дозрівання лімфоцитів з кістковомозкових попередників. Дозріванню лімфоцитів сприяють також інтерлейкіни 3, 4 і 6, а пригнічує їх дозрівання трансформуючий фактор

росту – TGF. Незрілі лімфоцити мають поверхневі IgD і FcR рецептори, які несуть маркер CD10, а також рецептори для цитокінів: IL – 3R і IL – 7R. У ході проліферації та диференціювання, лімфоцити набувають поверхневих антигенів гістосумісності 2 – го класу, рецептори для комплемента та поверхневі IgM. Дозрівання В – лімфоцитів, на відміну від Т – лімфоцитів, завершується в кістковому мозку, і до крові транспортуються малі лімфоцити, що несуть на своїй мембрані всі структури, що необхідні для участі у специфічній імунній відповіді [19].

### **1.1.1 Вплив віку на клітини кісткового мозку**

Відомо, що зі збільшенням віку організму спостерігається зниження функціональних характеристик тканин і органів [20]. Однак вплив віку організму на функціональні можливості стовбурових клітин, які можуть забезпечувати підтримку проліферації клітин в тих чи інших тканинах протягом життя, до сих пір остаточно не встановлено. Разом з тим, це важливо розуміти не тільки для з'ясування ролі стовбурових клітин в механізмах старіння, а й за розвитку регенеративної медицини.

У літературних джерелах зустрічаються суперечливі дані що до впливу віку донора на функціональні та морфологічні характеристики клітин кісткового мозку. Більш за все вивчена кореляція між віком і характеристиками гемопоетичних і мезенхімальних стовбурових клітин, які локалізовані в кістковому мозку. Це обумовлено потенціалом до диференціювання даного типу клітин. Серед існуючих даних можна виділити декілька точок зору щодо впливу віку донора на характеристики стовбурових і прогеніторних клітин кісткового мозку:

1. З віком кількість стовбурових клітин зменшується [21–23]. Пул «дорослих» стовбурових клітин в організмі може скорочуватися під впливом генетичних факторів, факторів зовнішнього середовища, харчування та способу життя. З вичерпанням резервів стовбурових клітин, інтенсивність і швидкість

старіння соматичних диференційованих клітин багатоклітинного організму значно прискорюється.

2. При старінні знижується реплікативна та проліферативна активність стовбурових клітин [24,25], залучені до підтримки стовбурових, цілісності геному та регуляції транскрипції, зазнають в мезенхімальних стовбурових клітинах вікову репресію, сприяючи реплікативному старінню стовбурових клітин *in vitro*. Мезенхімальні стовбурові клітини старіючого організму мають відмінні від клітин молодого організму патерни генної експресії і відрізняються за морфологією в культурі; відбувається перемикання на адіпогенне диференціювання, змінюється епігенетичний патерн та метаболізм клітин.

3. Старіння клітин мікрооточення призводить до арешту клітинного циклу і переходу стовбурових клітин в G0 період [26,27]. Стовбурові клітини не мають внутрішньої причини старіння і виконують свою функцію по самовідновлення організму до кінця життя, протидіючи старінню, але вплив вікових змін мікрооточення стовбурових клітин в старіючому організмі змінює їх властивості та функції. На тканинному рівні старіння може бути обумовлено розпадом міжклітинних взаємодій. Так, апоптоз одних клітин призводить до загибелі інших клітин і наростаючого зниження синтезу цитокінів, за допомогою яких дані клітини підтримували один одного. Старіючі соматичні клітини секретують фактори (протеолітичні ферменти, запальні цитокіни, фактори росту), призводячи до старіння, що може змінити мікрооточення всередині тканини і привести до утворення пухлини.

Розглянемо детальніше вищезазначені точки зору. Одним з існуючих тверджень є те, що «старіння» стовбурових клітин лежить в основі старіння тканин, особливо з високим метаболізмом. Існує все більше доказів того, що старіння імунної системи ініціюється на вершині ієрархії гемопоетичної системи організму, і що старіння гемопоетичних стовбурових клітин безпосередньо сприяє онтогенетичним змінам в імунній системі [28].

Слід зазначити, що ряд дослідників не виявили вік – залежних особливостей в диференціюванні мезенхімальних стовбурових клітин [29–32];

тим не менш, існує ряд досліджень, що демонструють зміни в диференціюванні, а також вказують на зміни в проліферації, старінні або самооновленні мезенхімальних стовбурових клітин у мишей [33], щурів [34,35], і людини [36, 37]. Використавши жирову тканину мишей, було виділено мезенхімальні стовбурові клітини і виявлено вік – залежне зниження адипогенного диференціювання, але не здібність мезенхімальних стовбурових клітин диференціюватися в остеогенному напрямку [38]. У той же час, також було виявлено зворотну кореляцію між цими показниками [39]. В інших дослідженнях було показано значне зменшення можливості диференціації стовбурових клітин зі збільшенням віку донора, особливо для остеогенної [40, 41], хондрогенної [42], і міогенної [43] диференціації. Також є дані, що репопуляційна активність отриманих з кісткового мозку старих мишей, C57BL/6 вище, ніж у молодих тварин [44–46]. І навпаки, гемопоетичні стовбурові клітини, що виділені у старих мишей, C57BL/6 не так ефективно проліферують у культурі, в порівнянні з такими, виділеними у молодих тварин [47, 48]. Одна з причин цих відмінностей може пояснюватися відмінностями в клітинних популяціях, які використовують для проведення подібних досліджень. В іншому дослідженні повідомлялося, що вікове зниження кількості мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку старих тварин, є незначним [49], в той час, як інші дослідники зафіксували значущу різницю між даним типом клітин кісткового мозку різновікових тварин [50]. Розбіжності в отриманих даних можуть бути пов'язані з методологією використання суспензії клітин кісткового мозку та, зокрема, зі складним характером вікових змін мікрооточення.

У багатьох дослідженнях для аналізу проліферативної активності клітин кісткового мозку використовували колонієстимулюючий фактор фібробластів [51]. У цих дослідженнях порівнювали імунофенотип, проліферацію, диференціювання і здатність імунної модуляції та адгезії мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку старих і молодих тварин.

Процеси старіння можуть впливати на потенціал диференціації

мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку в системі *in vivo*. Такі дані складно екстраполюються на систему *in vitro*. Однак, чи відбувається це в природних умовах до цих пір залишається спірним. Більшість досліджень, спрямованих на вивчення співвідношення між віком даного типу клітин і диференціюванням аналізували в системі *in vitro*.

Крім мезенхімальних стовбурових клітин, в кістковому мозку локалізовані гемопоетичні стовбурові клітини. Гемопоетичні стовбурові клітини продукують клітини крові та клітини імунної системи протягом всього життя. Дані, отримані в експериментах, проведених на мишах, демонструють вікове зниження функції стовбурових клітин [52]. Припускають, що гемопоетичні стовбурові клітини, отримані у старих тварин, мають недостатній потенціал, щоб забезпечити необхідний рівень гемопоезу. При трансплантації попередників гемопоетичних клітин, отриманих у старих тварин, молодим тваринам спостерігали редукцію тривалого потенціалу депопуляції [53], зокрема, лімфопоез зменшувався, в той час як інтенсивність мієлопоеза зростала [32]. Повідомляється про збільшення загальної кількості клітин – попередників у мишей лінії C57BL/6 зі збільшенням віку [33]. У нещодавніх дослідженнях гемопоетичних стовбурових і прогеніторних клітин, отриманих у старих тварин, показали, що підвищена експресія певних протоонкогенів може лежати в основі деяких з цих спостережуваних змін [53].

Незважаючи на те, що наявні дослідження досить суперечливі, результати дослідження, представлені в статті інших дослідників, надають переконливі свідчення про основні вікові альтерації функцій гемопоетичних стовбурових клітин [30, 54]. Для того щоб отримати відомості про молекулярні механізми, що лежать в основі цих дефіцитів, визначали вплив експресії гена в гемопоетичних стовбурових клітинах на вікові функції в масштабі всього геному в нормальному і прискореному старінні у p53 мутантної лінії мишей. У даній роботі були визначені загальні вікові зміни в експресії гена в мишачих гемопоетичних стовбурових клітинах, з метою ідентифікації механізмів, які могли бути відповідальні за пов'язане з віком зниження функцій гемопоетичних стовбурових

клітин. Гени, що залучені в запальний процес і реакції стресу, домінували над групою позитивно – регульованих генів, тоді як ті гени, які беруть участь в регулюванні функцій хроматину і репарації ДНК, були ідентифіковані серед негативно – регульованих генів. В іншому дослідженні було встановлено, що старіння гемопоетичних стовбурових клітин пов'язано з експансією компартмента гемопоетичних клітин [30,54]. Крім того, гемопоетична реконструкція стовбурових клітин у старих тварин була мієлоїдно – обумовленою, у порівнянні з реконструкцією гемопоетичних стовбурових клітин, отриманих у молодих тварин [53–57].

Таким чином, на даний час більшість досліджень схилиються в підтримку гіпотези про те, що старіння стовбурових клітин відіграє важливу роль в реалізації ефектів старіння на функцію органів, і, в кінцевому рахунку, впливають на тривалість життя ссавців. Саме старіння впливає як кількісно, так і якісно на функції стовбурових клітинах. В кінцевому рахунку, якісні зміни є більш важливими, так як вони впливають на потенціал самооновлення, потенціал розвитку і взаємодія з зовнішніми сигналами (мікрооточення).

Існує достатньо доказів про зменшення здатності до самооновлення, обмеження потенціалу розвитку, і зниження числа нащадків старих стовбурових клітин. Однак, в той же час, проведені дослідження [46,54], дозволяють вважати, що з віком дані ефекти можуть і не спостерігатися. В цілому, єдиної думки про вплив віку організму на стовбурові клітини, поки, немає. Відомо, що клітинний гомеостаз полягає в тому, що загиблі клітини заміщуються новими клітинами завдяки диференціювання тканеспецифічних стовбурових клітин. Були проведені роботи, в яких було показано, що дана парадигма може бути дотримана не для всіх органів і патологій. Так, пошкодження можуть індукувати міграцію популяції не тканеспецифічних стовбурових клітин. До таких, в першу чергу, відносять стовбурові клітини, які локалізовані в різних органах, включаючи кістковий мозок. Це спостереження викликало значний інтерес в області захворювання печінки, де потрібні нові стратегії відновлення числа гепатоцитів і протидії прогресуючого фіброзу даного органу [58].



Виходячи з проаналізованих даних, можна зробити висновок, що існуючі точки зору онтогенетичної зміни пулу стовбурових клітин, поки не дозволяють відтворити повну картину того, що саме відбувається зі стовбуровими клітинами в процесі старіння організму [2, 59-62].

### **1.1.2 Роль клітин кісткового мозку у розвитку патологій печінки**

В даний час вже накопичено достатньо експериментальних і клінічних спостережень, які свідчать про те, що при хронічному пошкодженні печінки аутогенні, аlogenні та ксеногенні гемопоетичні стовбурові клітини, а також мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку, при введенні в організм, здатні надавати відновлюючий вплив на структуру і показники функції пошкодженої печінки [2, 59–69].

У ряді робіт було показано, що мезенхімальні стовбурові клітини зберігають здатність до диференціювання в функціональні гепатоцитоподібні клітини і епітеліальні клітини печінки *in vitro* [70, 71], які, подібно до гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку, можуть бути отримані в великих кількостях. Крім того, було продемонстровано, що мезенхімальні стовбурові клітини сприяють генерації гепатоцитів *de novo* [72] і сприяють секреції трофічних молекул [73].

В останні роки була показана можливість розвитку гепатоцитів безпосередньо зі стовбурної кровотворної клітини [74], тобто з клітин мезенхімальної, а не ентодермальної природи. Зокрема, було показано, що здатність до диференціювання в повноцінні гепатоцити мають гемопоетичні стовбурові клітини і також мультипотентні дорослі прогеніторні клітини кісткового мозку [75].

Також у літературі обговорюється два альтернативних шляхи репопуляції гепатоцитів клітинами кісткового походження. По – перше, така субпопуляція клітин кісткового мозку може виходити в кровоток, піддаватися хоумінгу в печінку і диференціюватися в гепатоцити. Ці клітини можуть бути або

загальними мультипотентними попередниками гепатоцитів і клітин крові, або спеціалізованими ентодермальними прогеніторними клітинами. По – друге, кістковомозкові клітини можуть зливатися з гепатоцитами, що створює ілюзію їх диференціювання в клітини печінки [76]. Цікавою знахідкою стало виявлення в печінці в процесі раннього гістогенезу і при регенерації клітин, які одночасно експресують маркери мезенхімальних клітин (десмін) і маркери цитоскелету епітеліальних (печінкових) клітин (цитокератини), а також виявлення стовбурових клітин, які експресують тільки цитокератини, та гепатобластів, що продукують десмін. Наявність в гепатобластах і стовбурових клітинах печінки, що розвивається, маркера мезенхімальних клітин дозволило висунути гіпотезу про те, що стовбурові клітини можуть служити джерелом появи гепатоцитів в печінці в процесі її гістогенезу [77]. Є дані, що підтверджують не тільки тісний зв'язок проліферації овальних клітин (клітини печінки або клітини Іто) з проліферацією синусоїдальних клітин [78], а й дані про можливе диференціювання клітин Іто до печінкового епітелію [79], яке було назване мезенхімально – епітеліальною трансформацією перисинусоїдальних клітин.

Було встановлено, що введення стовбурових / прогеніторних клітин кісткового мозку мишей з CCL<sub>4</sub> – пошкодженої печінкою і сформованим в ній фіброзом, знижує летальність, підвищує рівень альбуміну в крові, знижує активність трансамінази [80-82], підвищує рівень антиоксидантного захисту [80] і надає фібролітичний ефект [63–69]. Вважають, що активація відновних процесів в печінки, що була змінена внаслідок розвиток цирозу, може бути обумовлена збільшенням кількості овальних клітин в перипортальній зоні вже через один тиждень після трансплантації стовбурових / прогеніторних клітин кісткового мозку [63], зниженням експресії мРНК проколагену 1 типу,  $\alpha$  – SMA і TGF –  $\beta$ 1 в ці ж терміни за рахунок індукції апоптозу активованих клітин Іто, а також може бути обумовлена підвищенням кількості високоплідних гепатоцитів (8n і 16n) в збереженій паренхімі печінки, які утворились за рахунок активізації механізмів клітинного злиття [81].

Слід зазначити, що характер та інтенсивність відновлювальних процесів у

печінці залежать, з одного боку, від тяжкості ушкодження печінки, а з іншого – від ступеня збереження біорегуляторної активності клітин кісткового мозку. Так, при помірному ступені ураження печінки, поява донор – залежних гепатоцитів в печінці після трансплантації алогенних клітин кісткового мозку варіювала від 1 до 5 % [82].

У нашій лабораторії було показано, що введення експериментальним тваринам стовбурових клітин тваринам з експериментальним фіброзом печінки забезпечувало нормалізацію показників імунної системи, а саме IgA, IgM та пептидів середньої молекулярної маси до контрольного рівня [83].

У той же час, при більш вираженому ураженні печінки, кількість донор – залежних гепатоцитів ставало достовірно вище і досягало в окремих спостереженнях (при вираженому фіброзі печінки на тлі хронічного гепатиту С) – 43 % [84].

Наявні спостереження дозволяють зробити висновок, що залучення стовбурових / прогеніторних клітин кісткового мозку в процеси репаративної регенерації, зокрема печінки, відбувається найбільш активно в умовах, коли пошкоджена значна частина тканини печінки і коли необхідна ефективна компенсація проявів печінкової недостатності. В умовах фізіологічної регенерації процес репопуляції печінки клітинами кісткового мозку, мабуть, також має місце, але відбувається з мінімальною інтенсивністю, і це дало підставу вважати, що мітотична активність гепатоцитів в печінці регулюється тільки печінковими факторами без участі стовбурових / прогеніторних клітин кісткового мозку. Середні терміни репопуляції клітин печінки під впливом клітин кісткового мозку варіюють. Так, у мишей і щурів цей процес триває від декількох тижнів до декількох місяців [85], у людини репопуляції клітин печінки реєструється вже через 2 тижні після їх трансплантації і зберігається тривалий час [86].

На моделі гострої печінкової недостатності виявили вплив ембріональних стовбурових клітин на синтез ДНК та яРНК у печінці щурів, що регенерує [87–88].

Попадання стовбурових / прогеніторних клітин кісткового мозку в печінку відбувається різними способами їх введення: при внутрішньовенному, внутріпортальному, інтраперитонеальному, а також при введенні клітин під капсулу селезінки [89–90].

Одним з механізмів їх міграції є трансендотеліальна міграція, за рахунок продукції пошкодженими клітинами печінки прозапальних сигнальних молекул, зокрема, SDF – 1 – хомінгового білка, рецептори якого експресуються стовбуровими / прогеніторними клітинами кісткового мозку [91, 92].

Важливою обставиною, яка інтенсифікувала дослідження із застосуванням клітин кісткового мозку для відновлювальної регенерації пошкодженої печінки, стали численні спостереження здатності гемопоетичних і мезенхімальних стромальних стовбурових клітин, клітин пуповинної крові і крові дорослої людини диференціюватися в гепатоцитоподібні клітини [93–99], а також спостереження, що доводять появу в печінці, після введення клітин кісткового мозку, функціонально повноцінних гепатоцитів кістковомозкового походження, які забезпечують корекцію модельованої печінкової недостатності [100–103].

При цьому практично всі вчені сходяться на думці, що здатність стовбурових клітин кісткового мозку диференціюватися під впливом печінкового мікрооточення в гепатоцитоподібні клітини, що виявляється експресією в них специфічних печінкових генів, а також здатність клітин мієломоноцитарного ряду до гібридизації (хімеризації) в результаті їх злиття з гепатоцитами обумовлені їх пластичністю [104, 105].

Дослідженнями останніх років встановлено, що в пошкодженій печінці може мати місце гібридизація клітин печінки після введення клітин кісткового мозку в організм стають не стільки гепатоцити (0,6% від всієї популяції гепатоцитів), скільки зірчасті клітини (68 % всіх клітин Іто) і міофібробласти (70 % всіх клітин), так як саме вони включали Y – хромосому донорів – самців в результаті введення мишам – самкам з токсичним пошкодженням печінки клітин кісткового мозку [106]. Оскільки клітини Іто CD133<sup>+</sup> мають властивості прогеніторних клітин [107] і при направленому культивуванні починають

експресувати гепатоцитарні маркери – мРНК альбуміну та  $\alpha$  – фетопротейну, – то це дає підставу вважати, що клітини кісткового мозку здійснюють репрограмування і активізацію відновних процесів в печінці шляхом клітинної гібридизації (хімерізації) не стільки гепатоцитів, скільки непаренхіматозних клітин і, перш за все, клітин Іто. Поряд з пластичним ефектом, участь стовбурових / прогеніторних клітин кісткового мозку в регенерації печінки здійснюється парокінним шляхом за допомогою дистантно продукованих ними гуморальних факторів – цитокінів, хемокінів, ростових факторів – TNF –  $\alpha$ , IL – 1, IL – 6, LiF, IL – 10 , NGF, оксид азоту, VEGF [A і B], HGF, TGF –  $\beta$ , MMPs [2, 95, 96], TIMPs, FGF – 2,7, SCF і ін. [104 – 110], багато з яких надають регулюючий вплив на проліферацію гепатоцитів як *in vitro*, так і *in vivo* [111,112].

Особливий інтерес представляють дані про важливу роль SCF в репаративної регенерації печінки. З'ясувалося, що печінка є багатим джерелом SCF і що цей фактор стимулює проліферацію гепатоцитів при резекції печінки [113]. Крім того, виявилось, що клітини кісткового мозку, перш за все мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, також є продуцентами SCF [114]. Ці факти змушують припускати, що при дефіциті утворення SCF в печінці в результаті її резекції або пошкодження, активація освіти і доставки SCF клітинами кісткового мозку буде сприяти нормалізації функціональної активності не тільки гепатоцитів, а й непаренхіматозних клітин печінки – головних регуляторів мітотичної активності гепатоцитів, а також сприятиме проліферації і диференціювання стовбурових клітин печінки, тобто овальних клітин і клітин Іто, що репопулюють її паренхіму і забезпечують регрес фіброзування внутрішньоклітинної маси. Отже, клітини кісткового мозку можуть діяти по-різному на процеси регенерації печінки.

При порівняльному дослідженні терапевтичної ефективності аутогенних гемопоетичних стовбурових і мезенхімальних стромальних клітин при печінкової недостатності було показано, що результативність залежить від застосування останніх була вище як в експерименті [84], так і в клінічній практиці при дослідженні протизапальної і фібролітичної активності [115]. При

цьому вираженість протизапальної активності мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин на пошкодження обумовлена секрецією ними факторів, здатних нейтралізувати активність прозапальних цитокінів, наприклад, за рахунок NFkB – залежною секреції sTNFR – 1 [116].

При відповіді на питання про перевагу за видом мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин – недиференційованих або предиференційованих в гепатоцитарному напрямку (була підтверджена експресія гепатоцитарних маркерів), було встановлено, що незалежно від способу введення клітин (внутрішньовенно або під капсулу селезінки) регенераційні потенціал недиференційованих клітин реалізується регенераційні потенціал гепатоцитоподібних мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин [117].

Отриманий результат може бути пов'язаний зі зниженням при культивуванні *in vitro* експресії хемокінових рецепторів на гепатоцитоподібних клітинах, яке веде до відповідного зниження їх хемотаксичної реакції [118]. Можливо також, що більш висока реакційна активність мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин обумовлена їх меншою дифференційованістю, тому здатність продукувати ширший спектр чинників, які, діючи сумарно, прискорюють відновні процеси в пошкодженій печінці.

Підтвердженням цієї точки зору можуть служити дані про виражений антифібротичний ефект мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з плаценти людини у щурів з CCl<sub>4</sub> – пошкодженої печінкою, що дозволило авторам запропонувати застосування плацентарних мезенхімальних стромальних клітин для лікування захворювань печінки, які важко піддаються лікуванню [119].

### **1.1.3 Кістковий мозок – депо стовбурових клітин, їх особливості та здатність до диференціювання**

Тривалий час не приймалося до уваги те, що кістковий мозок містить гетерогенну популяцію стовбурових клітин [120 – 125]. Однак, цілою низкою

експериментів було показано, що в кістковому мозку, крім гемопоетичних стовбурових клітин, знаходиться пул негемопоетичних клітин [126 – 129]. Деякі дослідники [129] вважають, що типи негемопоетичних стовбурових клітин запасуються в кістковому мозку на ранніх стадіях розвитку, де вони знаходять сприятливе мікрооточення для виживання. Більш того, припускають, що протягом раннього розвитку плюрипотентні / мультипотентні ембріональні стовбурові клітини можуть заселяти різні органи, включаючи кістковий мозок. Отже, кістковий мозок потенційно може містити весь спектр гетерогенної популяції стовбурових клітин, починаючи з ранніх плюрипотентних стовбурових клітин до негемопоетичних стовбурових клітин, при цьому кістковий мозок може служити універсальним джерелом стовбурових клітин для регенерації / відновлення тканин в процесі онтогенезу організму.

У ссавців протягом другого триместру гестації основним органом кровотворення є фетальна печінка. Кістковий мозок на цьому періоді онтогенезу містить стовбурові клітини, які генерують хондроцити, остеобласти і фібробласти. Ці клітини є ембріональними мезенхімальними стовбуровими клітинами, які є попередниками для клітинної лінії сполучної тканини. Так, культивування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку при використанні спеціалізованих поживних середовищ призводить до диференціювання їх в остеобласти, хондроцити, клітини гладкої мускулатури і адипоцити [130]. Швидкий розвиток / експансія гемопоетичних тканин відбувається в кінці другого триместру гестації, коли фібробласти і остеобласти в зародковій кістці починають секретувати хемокін – стромальний фактор – 1 (SDF – 1), який є хемоаттрактанти для гемопоетичних стовбурових клітин, що експресують специфічний трансмембранний G – білок, що пов'язується рецептором CXCR4 і сприяє міграції стовбурових клітин з фетальної печінки в кістковий мозок [131, 132]. Дослідження на нокаутних мишах показали, що SDF – 1 – CXCR4 грає ключову роль в колонізації кістковомозкових стовбурових клітин і у встановленні гемопоезу в кістковому мозку дорослих організмів, так як у нокаутних ембріонів миші в кістковому мозку порушується гемопоез. Це

показує, що SDF – 1 – CXCR4 є одним з ключових регуляторів хоумінгу / утримання стовбурових клітин в кістковому мозку, при цьому SDF – 1 є лігандом тільки для CXCR4, а CXCR4 пов'язує тільки SDF – 1 [133].

Доказом присутності стовбурових клітин в дорослому організмі є дослідження А. Я. Фріденштейна, який виявив СК в мезенхімі (стромі) «дорослого» кісткового мозку [119]. У дорослому кістковому мозку присутня гетерогенна популяція стовбурових клітин кісткового мозку [129]. Гемопоетичні стовбурові клітини тканеспецифічні для гемо/ лімфопоезу і є найбільш численною популяцією стовбурових клітин в кістковому мозку. Ці клітини, окрім CXCR4, експресують CD34, CD45, CD133, CD117 і лінії негативних маркерів (lin<sup>-</sup>) [134].

Кістковий мозок також містить популяцію ендотеліальних стовбурових / прогеніторних клітин, які можуть виходити з кісткового мозку, циркулювати в периферичній крові, сприяти регенерації пошкоджених клітин судин, серця, підшлункової залози, легень. Ендотеліальні стовбурові клітини експресують CD34, VEGFR2 (KDR), TIE2 і негативний маркер CD45 [135]. ГСК і ендотеліальні ТСК в ембріогенезі мають загального попередника – гемангіобласт. Відомо, що в кістковому мозку, крім перерахованих вище клітин, є мезенхімальні стовбурові клітини, які експресують Stro – 1, CD – 90 (Thy – 1) і CD106 антигени, і можуть *in vitro* диференціюватися в адипоцити, хондроцити, остеобласти [136]. Є також експериментальні дані, що показують здатність мезенхімальних стовбурових клітин диференціюватися в нервові клітини, кардіоміоцити і інші клітини [128, 129]. Мультипотентні дорослі прогеніторні клітини спочатку були описані як мезодермальні прогеніторні клітини, але дослідження показали, що вони можуть «переходити» кордон зародкових шарів і диференціюватися не лише в кістку, хрящ або клітини гладкої мускулатури (мезодерму), але також в гепатоцити, клітини підшлункової залози (ендодерму) або нервові клітини (ектодерму) [130, 137, 138]. Так, плюрипотентні стовбурові клітини, виділені з м'язової тканини, здатні диференціюватися в гемопоетичні клітини, міоцити, нервові клітини і адипоцити в культуральному середовищі, що



стимулює гематопоетичне, міогенне, нейрогенне і адіпогенне диференціювання. CXCR4<sup>+</sup> негемопоетичні стовбурові клітини, виявлені в кістковому мозку, експресують мРНК для маркерів ранніх тканеспецифічних стовбурових / прогеніторних клітин скелетної мускулатури (Myf – 5, Myo – D), кардіоміоцитів (Nkx2.5, GATA – 4, Mef2C), нервових клітин (GFAP, nestin), ендотеліальних (VE – кадерін), клітин підшлункової залози (Nkx6.1, Pdx1, Ptf1) і печінки (CK19, фетопротеїн). Ці клітини мають фенотип у людей CXCR4<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> CD45<sup>–</sup> і CXCR4<sup>+</sup> Sca – 1<sup>+</sup> c – kit<sup>+</sup> CD45<sup>–</sup> у мишей [131, 136 – 138].

Крім недиференційованих клітин, в кістковому мозку локалізовані спеціалізовані клітинні типи різного ступеня диференційованості. До таких відносять клітини еритроїдного, міелоїдного, гранулоцитарного і лімфоїдного клітинних ростків (Рис. 1.1) [139].

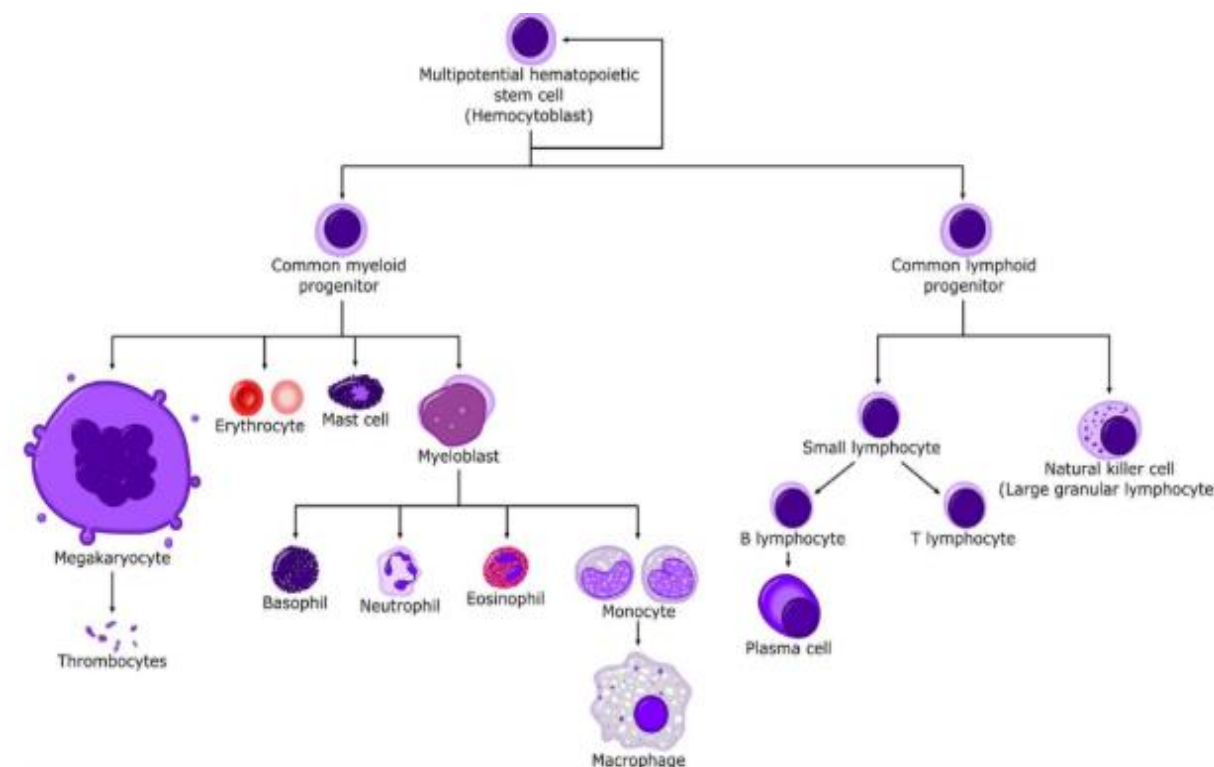


Рис. 1.1 Гемопоез у клітинах кісткового мозку [139]

Кожен з цих ростків дає, відповідно, такі клітини і постклітинні елементи: еритроцити; еозинофіли, нейтрофіли і базофіли; лімфоцити; моноцити; тромбоцити.

Ранніми попередниками еритроцитів є еритробласти і проеритробласти. Ці клітини, накопичивши певну кількість гемоглобіну, перетворюються в

поліхроматофільні еритробласти [10, 140, 141]. Розрізняють ранні, середні та пізні поліхроматофільні нормобласти. Велика частина нормобласних клітин втрачає ядро на стадії пізнього поліхроматофільного нормобласту. Стадію оксифільного нормобласту проходять близько 20 % клітин. Після виміщення ядра з клітини, нормобласти перетворюється в кістковомозковий ретикулоцит, який уявляє собою незрілі еритроцити, що містять залишки РНК; мають зернисто – сітчасту субстанцію (агрегати з мітохондрій, рибосом, залишків ЕПР та інших органел) [141].

Даний тип клітин може абсорбувати молекули заліза завдяки рецепторам до трансферрину, які є на мембрані молодих ретикулоцитів. У міру дозрівання в ретикулоцитах знижується вміст РНК і змінюється структура мембрани [142]. Еритроцити – зріла клітина периферичної крові рожево – червоного кольору. Еритроцити виконують дихальну (за рахунок гемоглобіну), трофічну (адсорбція на їх поверхні амінокислот, які транспортуються до клітин організму від органів травлення), захисну (визначається їх здатністю зв'язувати токсини за рахунок наявності на їх поверхні антитіл), ферментативну (є носіями ферментів) функції [143]. Крім того, еритроцити регулюють рН крові за рахунок утворення гемоглобинової буферної системи. Участь гемоглобіну в регуляції рН крові пов'язано з його роллю в транспорті кисню і вуглекислого газу [144].

До клітин гранулоцитарного ростка відносять мієлобласти, промієлоцит, мієлоцит, метамієлоцит і паличкоядерний гранулоцит, сегментоядерний гранулоцит. Першою клітиною в ряду гранулоцитопоеза, що морфологічно визначається, є мієлобласти. Наступною стадією розвитку в гранулоцитарному ряді є промієлоцит. Промієлоцит – перша клітина гранулоцитарного ряду, в якій з'являється специфічна зернистість. Залежно від типу специфічної зернистості промієлоцит відносять до нейтрофільному, еозинофільному або базофільному типу [142, 143].

Мієлоцит є більш зрілою клітиною гранулоцитарного ряду. Залежно від характеру зернистості розрізняють мієлоцити нейтрофільні, еозинофільні і базофільні. Наступні клітини гранулоцитарного ряду – метамієлоцит,

паличкоядерний і сегментоядерний нейтрофіл, що не здатні до проліферації і відносяться до дозріваючим клітинам [144].

У метамієлоцитів ядро складає близько половини клітини. Нейтрофіли першими прибувають на місце пошкодження тканин або в осередок запальної реакції. Їх поява в осередку запалення пов'язана зі здатністю до активного пересування, за рахунок псевдоподій [144, 145].

Для еозинофілів характерне ядро, що складається зазвичай з двох сегментів, яке займає меншу частину клітини. Основна функція еозинофілів полягає в знешкодженні та руйнуванні токсинів білкового походження, чужорідних білків, комплексів антиген – антитіло [142, 144].

У базофілів ядро складається, як правило, з 3 сегментів. Функції базофілів пов'язані з наявністю в них біологічно активних речовин. Вони продукують гістамін і гепарин. Кількість базофілів збільшується під час регенеративної фази гострого запалення і при хронічному запаленні. Гепарин базофілів перешкоджає згортанню крові в осередку запалення, а гістамін розширює капіляри, що сприяє розсмоктуванню і загоєнню [10, 142].

Клітини тромбоцитопоетичного ростка в кістковому мозку представлені мегакаріобластами, промегакаріоцитами і мегакаріоцитами. Мегакаріобласт – наймолодша морфологічно розпізнавана клітина тромбоцитопоеза. Мегакаріобласти диференціюється в промегакаріоцити, які диференціюється в мегакаріоцит. Клітини тромбоцитопоетичного ряду здатні до агрегації. Так при пошкодженні судин вони руйнуються, що спричиняє вивільнення тромбосанів у кров'яне русло, викликаючи звуження кровоносних судин і агрегацію тромбоцитів [142, 144].

Клітини моноцитарного ряду представлені монобластами, промоноцитами та моноцитами [142, 145]. Моноцити секретують розчинні цитокіни, що впливають на функціонування інших ланок імунної системи. Цитокіни, що секретуються моноцитами, називають монокіни. Моноцити синтезують окремі компоненти системи комплементу. Вони розпізнають антиген і переводять його в імуногенну форму (презентація антигену) [145]. Моноцити продукують як

чинники, які посилюють згортання крові (тромбоксани, тромбопластини), так і чинники, що стимулюють фібриноліз (активатори плазміногену) [142].

#### **1.1.4 Вплив окислювального стресу на швидкість та направленість диференціювання клітин**

Важливу регуляторну роль у функціонуванні кісткового мозку може виконувати редокс – система організму.

Стовбурові клітини мають унікальний механізм для усунення негативного ефекту дії реактивних форм кисню (ROS). Даний механізм забезпечує збільшений антиоксидантний захист і унікальні редокс – залежні ефекти на ріст і диференціювання клітин [2, 146 – 149]. Стовбурові клітини кісткового мозку локалізовані, переважно, в ніші з низьким вмістом активних форм кисню. Нізькокиснева ніша в кістковому мозку обмежує продукцію активних форм кисню (ROS), забезпечуючи довгостроковий захист гемопоетичних стовбурових клітин (HSC) від стресу ROS [149]. Автори дослідження припускають, що рівень продукції ROS тісно корелює з інтенсивністю проліферації і диференціювання клітин кісткового мозку на ранніх стадіях онтогенезу [150-152]. В інших роботах показано, що локальний окислювальний стрес відіграє ключову роль у функціонуванні лімфоцитів. Таким чином, великий інтерес представляє подальше дослідження регуляторної ролі продуктів вільнорадикальних реакцій.

Окрім ендогенних факторів, що здатні впливати на швидкість та направленість диференціювання клітин кісткового мозку, на ці процеси впливає структуроване мікрооточення за участі різних сигнальних шляхів.

#### **1.2 Мікрооточення та його вплив на функції та проліферацію клітин кісткового мозку**

Стромою кісткового мозку є ретикулярна сполучна тканина, безпосередньо створює мікрооточення («нішу») для кровотворних клітин. Крім

цього, до елементів мікрооточення відносять також фібробласти, остеобласти, адипоцити, адвентиціальні та ендотеліальні клітини, і інші [153], які впливають на молекулярний склад «ніші».

Термін «ніша» стовбурових клітин вперше був запропонований ще в 1978 році Р. Скофілдом для клітинного мікрооточення, необхідного для підтримки функції клітин і координації їх поведінки з потребами організму [154]. За сучасними уявленнями «ніша» – це сполучна ланка контролю і регуляції між клітиною і цілісним організмом.

Властивостями «ніші» є реалізація наступних функцій. Забезпечення стовбурових клітин факторами необхідними для її самопідтримки, самооновлення і диференціювання; взаємний контроль і обмін інформацією між клітинами, а також координація їх функцій. Крім того, компоненти «ніші» забезпечують координацію між різними популяціями клітин, регулюючи їх орієнтацію і місце розташування в тканинному компартменті, і, як наслідок, регулюють морфогенез і функції тканин [155, 156]. В основі функціонування «ніші» лежить безліч взаємопов'язаних механізмів. До таких відносять міжклітинні взаємодії між стовбуровими клітинами і сусідніми диференційованими клітинами; взаємодії між стовбуровими клітинами і компонентами позаклітинного матриксу; наявність або відсутність гіпоксії; фактори росту і цитокіни; фізико – хімічний стан навколишнього середовища (рН, її іонна сила, і зокрема концентрація іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ; наявність метаболітів і енергоносіїв, таких як АТФ) [157–164]. Одним з ключових шляхів взаємодії між стовбуровими клітинами і елементами «ніші» є мікроРНК [164, 165].

«Ніша» може бути представлена одним або декількома типами взаємодіючих між собою клітин, а також клітинами разом з позаклітинними структурами, такими як позаклітинний матрикс. Клітини «ніші» можуть бути джерелом факторів, що секретуються, і носіями рецепторів, розміщених на клітинній поверхні. До числа гормональних і парокінних чинників, контролюючих оновлення популяції клітин, диференціювання і апоптоз відносять: різні сигнальні шляхи; різні фактори росту; стромальних фактори –

хемокіни [166, 167].

Встановлено, що клітинами «ніші» для гемопоетичних стовбурових клітин є остеобласти, остеокласти, мезенхімальні попередники, ретикулярні клітини [168–172].

Елементами мікрооточення також є клітини строми кісткового мозку. Ретикулярні клітини кісткового мозку відрізняються поліморфізмом [173]. У ретикулярних клітин є великі ядра багаті еухроматином, а по периферії розташована вузька ділянка гетерохроматина. Ретикулярні клітини виконують механічну функцію, секретуючи преколаген, глікозаміноглікани, проеластин і мікрофібрилярний білок, беруть участь у створенні кровотворного мікрооточення, специфічного для певних напрямків, що розвивають гемопоетичні клітини за рахунок утворення факторів росту та інших медіаторів [168].

Важливу роль у формуванні «ніші» грають фібробласти – клітини сполучної тканини. Основною функцією фіброblastів є синтез компонентів міжклітинної речовини: білків (колагену і еластину), які формують волокна; протеогліканів і глікопротеїнів основної аморфної речовини [144].

В утворенні кісткової тканини беруть участь і остеобласти. Їх форма подовжена, циліндрична, іноді неправильна. Іноді остеобласти сильно нагадують плазматичні клітини. Однак структура хроматину у плазматичних клітин «груба», у остеобlastів «ніжна» або «ажурна»; контури плазматичних клітин чіткі, у остеобlastів – розмиті [10].

Адвентиціальні клітини покривають понад 50 % зовнішньої поверхні синусоїдних капілярів. Вони уявляють собою малодиференційовані клітини фіброblastичного ряду. Під впливом еритропоєтину і інших чинників вони здатні скорочуватися, що сприяє міграції гемопоетичних клітин в кровоток [144].

Ендотеліальні клітини судин кісткового мозку беруть участь в організації строми і процесів кровотворення, синтезують колаген IV типу, гемопоєтини. Ендотеліоцити здатні до скорочувальних рухів, що призводить до виштовхування клітин крові в синусоїдного капіляри. Після проходження клітин

в кровоток, пори в ендотелії закриваються. Ендотеліоцити виділяють колонієстимулюючі фактори і білок фібронектину, що забезпечує адгезію клітин один до одного і субстрату [174].

Адиipoцити мають в центрі велику вакуоль, що містить жири, які використовуються для енергозабезпечення кровотворення, а для забезпечення загальних потреб організму не витрачаються. Як і інші клітини строми, адиipoцити виробляють гемопоетини [175]. Отже, строма кісткового мозку створює «гемопоетичне індукуюче мікрооточення», необхідне для проліферації, диференціації стовбурових клітин в кістковому мозку, розмноження і дозрівання мієлоїдних клітин.

### **Висновки до розділу 1**

Таким чином, кістковий мозок – унікальна тканина організму, яка забезпечує інтеграцію усіх типів клітин у єдину динамічну систему. Крім того, кістковий мозок забезпечує кровотворення, синтез імунокомпетентних клітин та підтримує регенераційний потенціал організму, оскільки є одним з депо стовбурових клітин. Слід зазначити, що кістковий мозок представлений гетерогенною популяцією клітин різного ступеня диференціювання. Разом зі стовбуровими клітинами, у кістковому мозку локалізовані всі формені елементи крові: еритроцити, гранулоцити, моноцити та тромбоцити. Крім того, в гемопоетичних тканинах кісткового мозку відбуваються і важливі етапи лімфопоезу: дозрівання В – лімфоцитів і початкові стадії дозрівання Т – лімфоцитів, які в подальшому дозрівають і функціонують в лімфоїдній тканині (тимус, периферична лімфатична система).

Сучасні літературні відомості дають уявлення про кооперативному взаємодії синусоїдальних клітин печінки і клітин кісткового мозку при здійсненні процесів фізіологічної, репаративної та патологічної регенерації печінки. Показано, що стовбурові / прогеніторні клітини кісткового мозку (гемопоетичні і мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини) заповнюють

регуляторну роль стовбурових клітин печінки, насамперед зірчастих клітин – клітин Іто, знижують вираженість процесів запалення і освіти фіброзу і, тим самим, модулюють процеси відновної регенерації пошкодженої печінки.

З огляду на численні дослідження, не викликає сумнівів вік – залежний вплив мікрооточення на направленість диференціювання клітин кісткового мозку, а також взаємозв'язок між різними функціональними станами печінки та клітинами кісткового мозку. У той же час, залишається відкритим питання, яким чином буде впливати мікрооточення, яке було змінено внаслідок зміни функціонального стану печінки, на поведінку клітин кісткового мозку молодих та старих тварин.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [2, 59-62, 120-125].



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1 Характеристика об'єкта дослідження

Експериментальні дослідження були виконані на 3 та 20 місячних щурах-самцях лінії *Wistar*. Усього в роботі було використано 192 тварини масою 120-240 грам. Щурів вирощували і утримували у віварії НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, з дотриманням стандартних умов утримання.

Тварини контрольної групи перебували на стандартному режимі годування віварію *ad libitum*.

Дослідження проводили відповідно до «Спільних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2011р.), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Старбург, 1986 р) [176, 177]. Також були враховані циркадні ритми формування біологічних відповідей.

Для цього тварини в один і той же час доби отримували їжу і всі маніпуляції (введення препаратів, виділення клітин кісткового мозку) здійснювали в один і той же час доби до прийому їжі. За 12 годин до виділення клітин кісткового мозку тварини не отримували їжу та клітини кісткового мозку виділяли завжди з 8 до 10 години ранку за місцевим часом. Підрахунок клітин і морфологічні дослідження здійснювали з 9 до 12 години за місцевим часом. Зупинку експериментальних процедур здійснювали зануренням тварин в ефірний наркоз з подальшим виділенням у них клітин кісткового мозку.



Через 24 години після останнього введення і через 5 діб від першого введення тварин присипляли та виділяли клітини кісткового мозку (Рис. 2.1) [2, 59-62, 120-125, 182].

Для створення моделі експериментального CCL4 – індукованого фіброзу печінки використовували 3-міс. і 20-міс. тварини. Тварини кожного віку були розділені на дві групи: контрольну – інтактні, яких утримували в стандартних умовах віварію; дослідну, яким багаторазово послідовно вводили чотирьох хлористий вуглець в концентрації 0,1 мл/100 г маси тіла [59, 60, 182]. Тваринам інтактної групи вводили фізіологічний розчин по тій же схемі. Через 24 години після останнього введення і через 5 діб від першого введення тварин присипляли та виділяли клітини кісткового мозку (Рис. 2.1) [2, 59-62, 120-125].

### **2.3 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на первинну культуру клітин кісткового мозку**

Групі тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки додатково вводили низькомолекулярні компонентні коров'ячого молозива (НКМ). НКМ отримували з молозива першого удою після пологів. Для цього видаляли всі ліпідні компоненти 3-х кратним сепаруванням, білки видаляли центрифугуванням при 6000 g – 10 хвилин при кімнатній температурі. Високомолекулярні білки видаляли шляхом послідовної мембранної фільтрації (0,65 → 0,45 → 0,22 мкм). Білковий склад НКМ визначали методом електрофорезу в градієнті (7,5 → 12 %) поліакріламідного гелю. До складу НКМ входили білки з мМ не більше 25 – 30 кДа [183].

### **2.4 Виділення клітин кісткового мозку**

Клітини кісткового мозку виділяли з діафізів, попередньо видаляли епіфізи, двох стегнових кісток молодих і старих тварин за методом [184]. Діафізи промивали охолодженим натрій-фосфатним буфером, який містив 137 мМ

хлориду натрія, 2,7 мМ хлориду калія, 10 мМ гідрофосфату натрія та 1,46 мМ монофосфату калія ( $\text{pH} = 7,2 - 7,4$ ) (пропис наведено нижче) під тиском за допомогою шприця з голкою великого діаметру до загального об'єму 10 мл з двох діафізів [2, 59-62, 120-125].

Для приготування натрій-фосфатного буфера використовували:

8 г  $\text{NaCl}$ , 0,2 г  $\text{KCl}$ , 1,42 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  та 0,24 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Солі розчиняли в 500 мл дистильованої води, перевіряли  $\text{pH} = 7,2 - 7,4$  і доводили об'єм до 1 л. Перед використанням розчин натрій-фосфатного буфера автоклаували.

Далі отриману кістномозкову суспензію клітин з тканинними фрагментами дезагрегували механічно – ресуспендуванням. Після чого клітини пропускали через нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм (cell dissociation sieve TKG, Sigma). Потім клітинну суспензію відмивали натрій-фосфатним буфером шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 3000 об / хв.

Еритроцити з клітинної суспензії видаляли шляхом одноразової обробки розчином, що містить 154 мМ хлориду амонію, 10 мМ бікарбонату натрію, 0,082 мМ ЕДТА (ХімЛаборРеактив, Україна) (пропис наведено нижче) протягом 10 хвилин при кімнатній температурі.

Для видалення еритроцитів з суспензії готували лізуючий розчин, який містив: 4,15 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 г  $\text{KHCO}_3$  та 15 мг ЕДТА. У сухій пробірці змішували зважені солі, потім розчиняли у 20-30 мл автоклавованої дистильованої води, доводили  $\text{pH} = 7,2-7,4$  та стерилізували шляхом фільтрації. Об'єм розчину доводили до 500 мл.

Потім кістковомозкову клітинну суспензію двічі відмивали 5 мл охолодженого натрій-фосфатного буфера. Після чого до отриманих клітинних суспензій додавали по 2 мл охолодженого натрій-фосфатного буфера і відбирали аліквоти, об'ємом 50 мкл в пробірки Еппендорфа для підрахунку клітин в камері Горяєва.

Для підрахунку клітин до аліквот додавали по 50 мкл розчину 0,4 % трипанового синього (Sigma, США), що був приготований на основі натрій-фосфатного буфера ( $\text{pH}=7,1 - 7,4$ ) та 100 мкл натрій-фосфатного буфера і

підраховували клітини. Далі розраховували концентрацію клітин у мл маткової суспензії по формулі для камери Горяєва з урахуванням розведення і визначали об'єм аліквоти так, щоб в кожній чашці Петрі концентрація клітин кісткового мозку була однаковою і становила  $2 \times 10^6$  клітин / мл.

Формула для визначення кількості клітин у камері Горяєва була наступна:

$$x = a \times 0,01 \times k, \quad 2.1$$

де

$a$  – кількість клітин у 5-ти маленьких квадратах, розташованих за діагоналлю,

0,01 – коефіцієнт камери Горяєва,

$k$  – коефіцієнт розведення.

## 2.5 Культивування клітин кісткового мозку *in vitro*

Клітини, отримані з двох стегнових кісток, культивували у пластикових чашках Петрі (35 мм, Nunk, Данія) в живильному середовищі, яке приготовано на основі 199 середовища (ВетМед, Україна) з додаванням антибіотиків (8 % гентаміцину і 8 % стрептоміцину) і 20% інактивованої фетальної телячої сироватки (Gibco, США). Культивування проводили при  $37^\circ \text{C}$  в стандартних умовах в атмосфері 5 %  $\text{CO}_2$  протягом 4 діб. Культуральне середовище при цьому не змінювали («накопичувальне культивування»). Початкова концентрація клітин кісткового мозку при культивуванні у всіх варіантах завжди становила 2 млн кл / мл [2, 59-62, 120-125].

## 2.6 Дослідження «поведінки» клітин кісткового мозку при внесенні у культуру сірчаноокислої міді

Для визначення впливу сірчаноокислої міді на культуру клітин кісткового мозку до суспензії вносили 4 мМ та 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . Для цього готували розчин з концентрацією 160 мМ, який автоклаували перед внесенням аліквот у

чашки з клітинами. Після чого визначали аліквоти таким чином, щоб кінцева концентрація  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  у чашках становила 4 мМ та 8 мМ [61].

Для приготування 160 мМ розчину  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  використовували:

200 мг  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  та додавали 5 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , ретельно розмішували та автоклавували.

У експериментальні чашки клітин кісткового мозку всіх аналізованих груп молодих та старих тварин вносили по 125 мкл та 250 мкл з розчину 160 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (пропис наведено вище) до кінцевого об'єму 5 мл, таким чином у цих чашках концентрація сірчаноокислої міді становила 4 мМ та 8 мМ, відповідно. У контрольні чашки з культурами клітин кісткового мозку вносили по 125 мкл натрій-фосфатного буфера.

## 2.7 Визначення кількості клітин та їх морфотипів

Підрахунок клітин кісткового мозку клітин здійснювали кожну добу шляхом підрахунку кількості клітин в фіксованих полях зору в камері Горяєва, потім визначали кількість з урахуванням розведення для камери Горяєва. Оцінку нативності плазматичної мембрани клітин в процесі культивування визначали в тесті з 0,4 % трипановим синім (Sigma, США), як описано в роботі [185]. При цьому прораховували не менше 100 клітин у рандомно обраних полях зору. Дані представляли у процентах від загальної кількості, прийнятої за 100 %.

Цитологічні препарати суспензії клітин кісткового мозку фіксували протягом 5 хвилин метиловим спиртом та переносили на 8-10 хвилин в робочий розчин готового барвника Романовського-Гімзе (розведення 1:20).

Після цього зразки промивали дистильованою водою і висушували на повітрі [2, 59-62, 120-125].

Цитологічні препарати аналізували при збільшенні 100 на мікроскопі «ZeissPrimoStariLED» (Німеччина).

Морфотипи клітин кісткового мозку визначали відразу після отримання суспензії клітин кісткового мозку, а також на 2-ї та 4-у добу культивування,

прораховуючи не менше 500 клітин у рандомно обраних полях зору. Дані представляли у процентах від загальної кількості, прийнятої за 100 % [186].

## **2.8 Визначення «тривалості життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі**

Для визначення тривалості життя мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів в системі *in vitro* підраховували їх кількість на 0, 48 і 96 ч культивування, прораховуючи не менше 500 клітин кожного з морфотипів, дані виражали в процентах від загальної кількості клітин у зразку [59, 60].

## **2.9 Визначення іонів кальцію у клітинах кісткового мозку**

Вміст внутрішньоклітинного кальцію визначали за допомогою специфічного зонда до іонів кальцію – Fluo-3. За для цього, до суспензії клітин, що містила 2 млн клітин у мл, вносили 10 мкг/мл Fluo-3, який був приготований на 3,03 mM фосфатному буфері, який містив 2,89 mM  $\text{CaCl}_2$  (ThermoFisher Scientific, USA).

Суспензію клітин з барвником інкубували протягом 15 минут за температури 24 °C, як описано [187]. Інтенсивність флуоресценції визначали на конфокальному мікроскопі LSM 510 META Carl Zeiss (Германія),  $\times 100$ , а вміст кальцію виражали у відносних одиницях [59].

## **2.10 Визначення іонів вільних форм кисню у клітинах кісткового мозку (ROS)**

До 50 мкл суспензії клітин ( $6 \times 10^6/\text{мл}$ ) вносили 5 мкл робочого розчину для визначення вільних форм кисню керуючись рекомендаціям фірми-виробника до набору Cellular ROS Assay Kit - Red (ab186027) [188].

Змішували піпетуванням на інкубували 15 хвилин в темному місці за кімнатної температури.

Для візуалізації вносили 30 мкл суспензії клітин до лунки скляного слайду (Thermo Scientific™ PTFE, 10632391) та накривали покривним склом товщиною 0,13 мм (Fisherbrand,12-542A). Слайд фіксували на робочому столі мікроскопу.

Візуалізацію клітин проводили методом конфокальної мікроскопії використовуючи лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Olympus FV10i-LIV (Olympus, Японія). Детекцію флуоресценції проводили за блакитним каналом для DAPI ( $\lambda_{Ex} = 405\text{nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 453\text{nm}$ ), зеленим каналом для Fluo 3 ( $\lambda_{Ex} = 506\text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 527\text{ nm}$ ) і червоним каналом для детекції ROS ( $\lambda_{Ex} = 520\text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 605\text{ nm}$ ). Чутливість детекторів та інтенсивність лазерів в усіх досліджених зразках були однакові. Величина конфокальної діафрагми дорівнювала 2,0. Зображення отримували використовуючи об'єктив  $\times 60$  із застосуванням водної імерсії. Проводили зйомку низки горизонтальних оптичних зрізів через весь об'єм клітин з шагом 0,5 мкм. Зображення зберігали для подальшої обробки та аналізу у форматі OIF як інтегральне зображення з поєднанням усіх оптичних зрізів, так і тривимірне зображення окремих клітин.

Використовуючи інтегроване програмне забезпечення Olympus FV4.1 проводили вимірювання відносної інтенсивності флуоресценції у кожній окремій клітині враховуючи фон.

Деконволюцію зображення та тривимірну реконструкцію об'єкту спостереження проводили з використанням програмного забезпечення Olympus CellSense Dimension Desktop [188].

30 мкл суспензії клітин вносили до лунки скляного слайду (Thermo Scientific™ PTFE, 10632391) та накривали покривним склом товщиною 0,13 мм (Fisherbrand,12-542A). Слайд фіксували на робочому столі мікроскопу.

Візуалізацію клітин проводили методом конфокальної мікроскопії використовуючи лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Olympus FV10i-LIV (Olympus, Японія). Детекцію флуоресценції проводили за зеленим каналом для Fluo 3 ( $\lambda_{Ex} = 506\text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 527\text{ nm}$ ) і червоним каналом для детекції ROS



( $\lambda_{Ex} = 520$  нм,  $\lambda_{Em} = 605$  нм). Чутливість детекторів та інтенсивність лазерів в усіх досліджених зразках були однакові. Величина конфокальної діафрагми дорівнювала 2,0. Зображення отримували використовуючи об'єктив  $\times 60$  із застосуванням водної імерсії. Проводили зйомку низки горизонтальних оптичних зрізів через весь об'єм клітин з шагом 0,5 мкм. Зображення зберігали для подальшої обробки та аналізу у форматі OIF як інтегральне зображення з поєднанням усіх оптичних зрізів, так і тривимірне зображення окремих клітин.

Використовуючи інтегроване програмне забезпечення Olympus FV4.1 проводили вимірювання відносної інтенсивності флуоресценції у кожній окремій клітині враховуючи фон.

Деконволюцію зображення та тривимірну реконструкцію об'єкту спостереження проводили з використанням програмного забезпечення Olympus CellSense Dimension Desktop [188].

### **2.11 Визначення вмісту іонів міді у клітинах кісткового мозку**

Для визначення вмісту іонів міді до 500 мл проб клітин кісткового мозку додавали по 1 мл сірчаної та 1 мл азотної кислот, після чого нагрівали за температури 140 °C протягом 1 години. Вміст іонів міді визначали на атомно - адсорбційному спектрофотометрі С-115-М1 (Україна).

### **2.12 Статистична обробка результатів дослідження**

Для статистичної обробки результатів досліджень використовували непараметричні методи варіаційної статистики.

Для характеристики отриманих вибірок використовували середнє, стандартне відхилення, стандартну помилку середнього, обсяг вибірки. Статистичну достовірність відмінностей між двома групами даних оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні (для малих і середніх вибірок,  $n \leq 30$ ) за допомогою програмного пакету Microsoft Office Excel 2010, а

також програмного пакету Statistica 8.0 фірми StatSoft. Відмінності між даними контрольних і експериментальних варіантів вважали достовірними при  $p < 0,05$ . Графічну візуалізацію отриманих результатів виконували у програмах Origin 8.5.1 фірми OriginLab Corporation та Apache OpenOffice.

## **Висновки до розділу 2**

В даному розділі було використано наступні методи: визначення фізіологічних параметрів поведінки клітин кісткового мозку молодих та старих тварин. Динаміка зміни кількості клітин кісткового мозку та ідентифікація морфотипів клітин у первинній культурі – морфологічний метод у цитологічних препаратах. Визначення вмісту іонів міді у культурі клітин кісткового мозку молодих та старих тварин – атомно-адсорбційний метод. Визначення іонів кальцію та вільних форм кисню – конфокальна мікроскопія. Були проведені статистичні методи оцінки отриманих результатів.

Ці методичні рекомендації були використані в наступних публікаціях [2, 59-62, 120-125].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1 Дослідження вік – залежних змін характеристик клітин кісткового мозку щурів у первинній культурі**

##### **3.1.1 Дослідження інтенсивності росту та патерну морфотипів первинних культур клітин кісткового мозку молодих і старих інтактних щурів**

Проблема старіння завжди викликала великий інтерес у дослідників, оскільки вона стосується кожного з нас. Незважаючи на це, вона далека від свого рішення. Більш того, поки не існує навіть єдиного загальновизнаного визначення «старіння» [189-191].

Більшість трактувань цього загально біологічного явища зводиться до того, що старіння – це дегенеративний процес, який визначається втратою надійності функціонування біологічних систем і, як наслідок, підвищенням «уразливості» від різноманітних екзогенних факторів [192].

Як відомо, найбільш ефективним методологічним прийомом пізнання є розробка і створення експериментальних моделей. Вони дозволяють не тільки досліджувати явища, але і перевіряти істинність висловлених гіпотез і дати прогноз поведінки систем в заданих умовах.

У зв'язку з цим, розробка експериментальних моделей, що дозволяють досліджувати механізми взаємодій метаболізму з комплексом факторів мікрооточення, може бути корисною у вирішенні глобальної проблеми – старіння. З огляду на багаторівневість регуляції метаболізму та наявність альтернативних шляхів метаболізму для вирішення завдань геронтології на теперішньому рівні досліджень, найбільш адекватними можуть бути клітинні моделі.

Ми вважаємо, що вдалою клітинної моделлю вік-залежних механізмів відгуку метаболічної системи на фактори мікрооточення можуть служити клітини кісткового мозку.

З метою визначення проліферативного потенціалу клітин кісткового мозку, які були отримані у молодих і старих тварин, визначали їх здатність до поділу в первинній культурі.

Досліджено вплив віку щурів на інтенсивність росту клітин кісткового мозку в первинній культурі, отриманої у молодих і старих щурів. Це може дати відповідь про вік-залежних зміни клітин кісткового мозку.

Виявили, що за першу добу культивування кількість клітин кісткового мозку, отриманих у молодих тварин, збільшилася на 60 %, а у старих тварин за цей же час – на 112 % (Рис. 3.1).

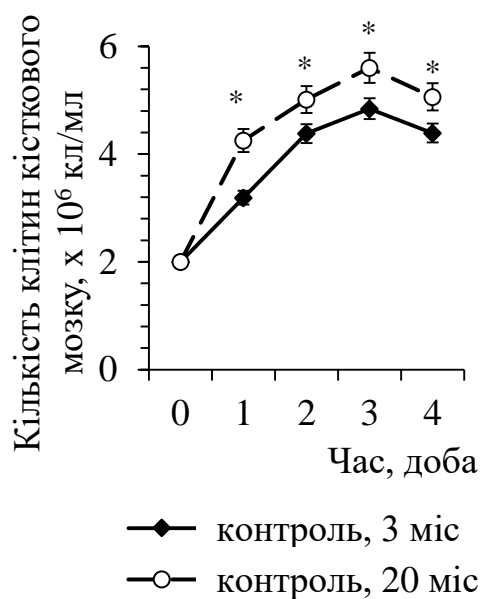


Рис. 3.1 Кількість клітин кісткового мозку з 1 по 4 добу культивування *in vitro*, що були отримані у інтактних 3 міс. (—●—) та інтактних 20 міс. (—○—) тварин (n = 12).

\*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у молодих тварин

Надалі приріст клітин у молодих і старих тварин в системі *in vitro* був однаковий і до 3-ї доби культивування вони виходили на стаціонарну фазу

росту (Рис. 3.1).

Як відомо, популяція клітин кісткового мозку представлена надзвичайно різноманітними типами, тобто є високо гетерогенною [193–194]. Така гетерогенність по морфотипам клітин кісткового мозку обумовлена декількома причинами: функціональною особливістю кісткового мозку: кістковий мозок – місце диференціювання клітин крові та імунокомпетентних клітин; – різницею в швидкості диференціювання та транспорту синтезованих клітин в кровоток; – функціональним «запитом» організму на тип імунокомпетентних клітин і клітин крові; – різницею відповідних реакцій клітин кісткового мозку на фактори мікрооточення.

У наших експериментах морфологічно чітко виявлялися 8 основних морфотипів клітин кісткового мозку у молодих і старих тварин (Рис. 3.2).

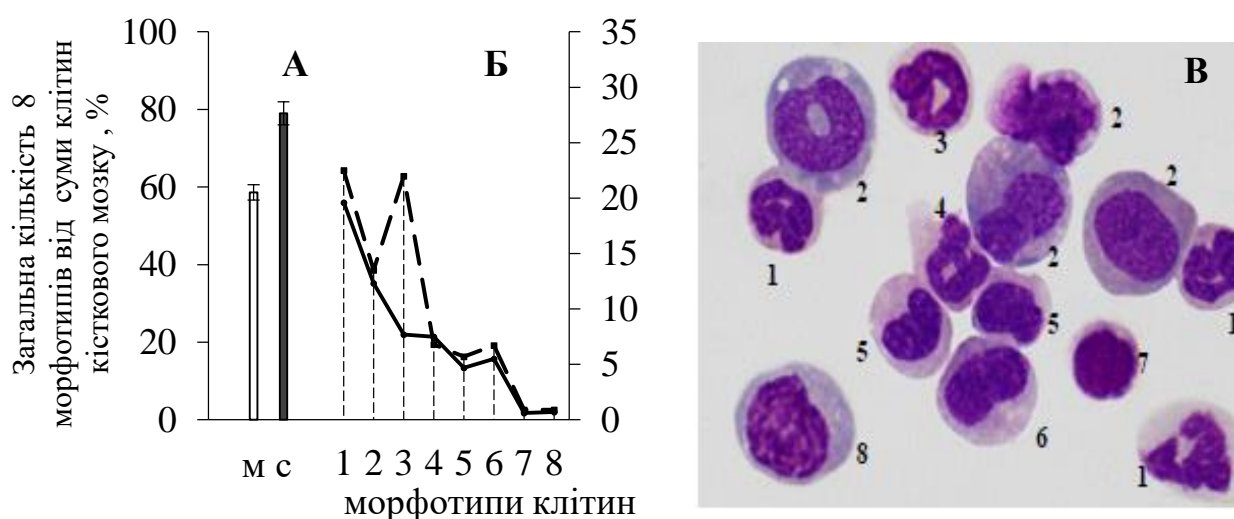


Рис. 3.2 Сумарна кількість клітин кісткового мозку від загальної кількості, в процентах, виділених у молодих (м) і старих (с) інтактних тварин, відповідно (А), і патерн морфотипів клітин кісткового мозку, відповідно у молодих (—•—) і старих (---•---) тварин, для інтактних груп (Б). Деякі морфологічні типи клітин кісткового мозку інтактних тварин (В): 1 – паличкоядерні нейтрофіли; 2 – метамієлоцити; 3 – лімфоцити; 4 – сегментоядерні нейтрофіли; 5 – мієлоцити; 6 – еозинофіли; 7 – базофіли; 8 – моноцити; 9 – недиференційована клітина. Забарвлення за Романовським-Гімзою, х 100

Кількість цих морфотипов у досліджуваних тварин представлені на

рисунку 3.2. Виявилося, що на ці 8 морфотипів у молодих інтактних тварин доводилося 58,6 % від усіх клітин кісткового мозку (Рис. 3.2 А).

З цього виходить, що інші 41,4 % – це морфологічно ідентифіковані типи клітин. У той же час, у інтактних старих тварин на ці 8 морфотипов припадало 79 %, тобто неідентифіковані типи клітин склали лише 21 % (Рис. 3.2 Б).

### **3.1.2 Дослідження «тривалості життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі з 0 до 96 години культивування**

У старих тварин була змінено не тільки кількість ідентифікованих морфотипов, але і співвідношення між типами клітин (Рис. 3.2). Найбільші відмінності між молодими і старими тваринами виявлялися в вмісті лімфоцитів. У старих тварин їх було в 2,8 рази більше, ніж у молодих тварин (Рис. 3.2 Б).

Отже, молоді та старі тварини різнилися між собою не тільки за загальною кількістю ідентифікованих морфотипов, але і співвідношенням цих клітин (патерн розподілу).

Як відомо, клітини кісткового мозку сильно розрізняються за тривалістю життя, від декількох діб до – десятка років [195]. У наступній серії експериментів визначали час збереження деяких типів клітин кісткового мозку в культурі, умовно їх «тривалість життя» в культурі.

Як відомо, нейтрофіли – це найчисленніша група лейкоцитів. Дозрівання нейтрофілів здійснюється в кістковому мозку зі стовбурної клітини і проходить ряд стадій: промієлоцит → мієлоцит → метамієлоцит → паличкоядерний нейтрофіл [196].

Культивування мієлоцитів в первинній культурі, де відсутні чинники диференціювання, може супроводжуватися швидкої деградацією. Ми вважаємо, що швидкість їх руйнування може бути різною у молодих і старих, інтактних тварин і тварин з Су – індукованим фіброзом печінки. Ці відмінності можуть бути пов'язані з епігенетичними особливостями, стадіями диференціювання, і, як наслідок, різними відповідями на нову систему мікрооточення (*in vitro*).

Виявилося, що збереження – «тривалість життя» різних типів клітин в первинній культурі, виділених у молодих і старих тварин, відрізнявся. Так, кількість мієлоцитів в первинній культурі, які були отримані у молодих інтактних тварин, зменшувалася майже лінійно і через 48 годин їх залишалося 48 %, а через 96 годин 39 % від початкової кількості (Рис. 3.3). Якщо ж мієлоцити отримані у старих тварин, то їх кількість зменшувалася з меншою швидкістю, і через 48 годин їх було 78 %, а через 96 годин – 66 %, тобто їх було майже в 2 рази більше ніж у молодих в цей же час (Рис. 3.3).

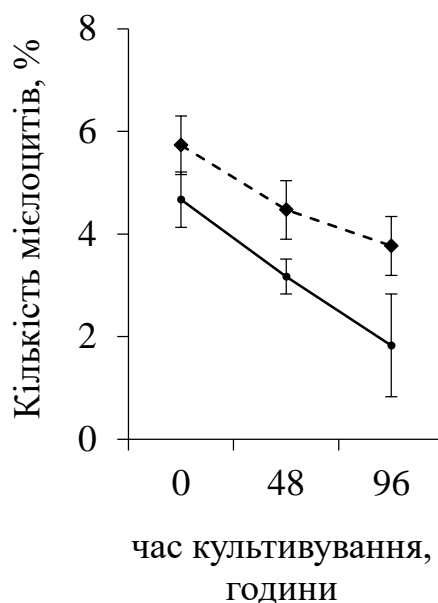


Рис. 3.3 Кількість мієлоцитів в первинній культурі, що отримана у інтактних 3 міс. (—●—) та 20 міс. (---■---) тварин

Вміст метамієлоцитів в процесі культивування зменшувалася з меншою швидкістю в порівнянні з мієлоцитами, якщо вони були отримані у інтактних тварин (Рис. 3.4). Так, через 96 годин їх кількість для молодих інтактних тварин становило 63 %, а для старих – 74 %, від початкової кількості.

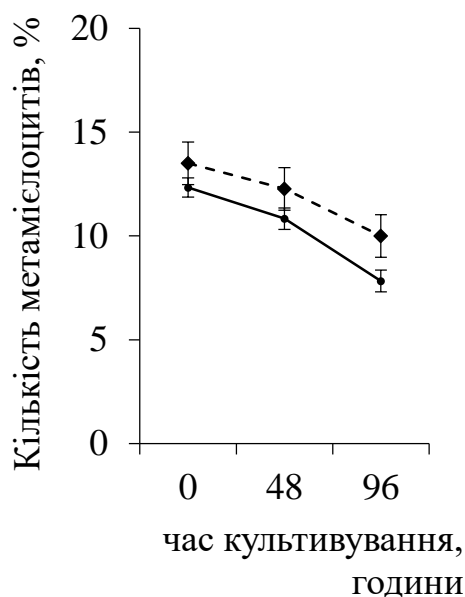


Рис. 3.4 Кількість метамієлоцитів в первинній культурі, що отримана у інтактних 3 міс. (—●—) та 20 міс. (---■---) тварин

Вміст паличкоядерних нейтрофілів в первинній культурі молодих і старих інтактних тварин зменшувалася в однаковій мірі (Рис. 3.5).

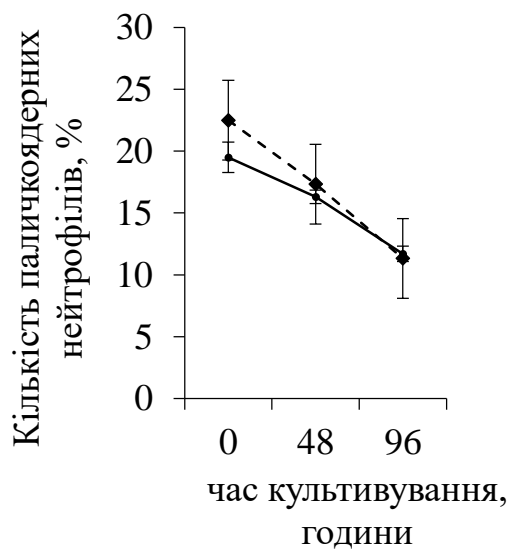


Рис. 3.5 Кількість паличкоядерних нейтрофілів в первинній культурі, що отримана у інтактних 3 міс. (—●—) та 20 міс. (---■---) тварин

Кількість сегментоядерних нейтрофілів не змінювалася протягом 96 годин культивування, якщо вони були отримані у інтактних як молодих, так і старих тварин (Рис. 3.6).



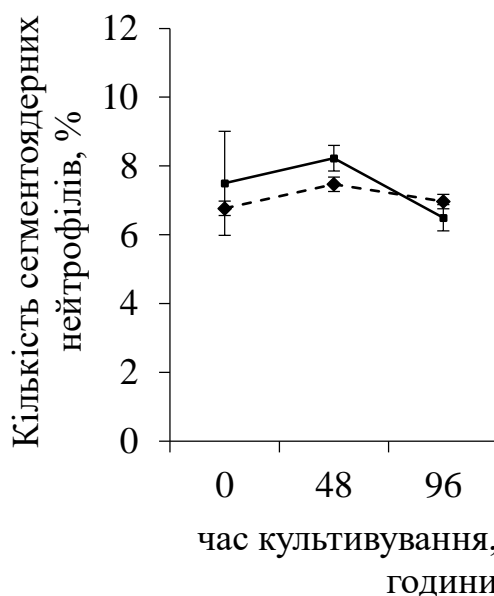


Рис. 3.6. Кількість сегментоядерних нейтрофілів в первинній культурі, що отримана у інтактних 3 міс. (—●—) та 20 міс. (---■---) тварин

Отже, «тривалість життя» в первинній культурі залежить від віку тварин.

### 3.1.3 Дослідження деяких характеристик іонного складу та редокс-системи клітин кісткового мозку молодих та старих інтактних тварин

Клітини кісткового мозку, отримані у старих (20 міс.) щурів містили на 73 % більше кальцію в порівнянні з клітинами кісткового мозку, отриманими у молодих (3 міс.) щурів (Рис. 3.7). У той же час, клітини кісткового мозку старих тварин містили в 5 разів менше іонів міді в порівнянні з клітинами кісткового мозку молодих тварин (Рис. 3.7).

Оскільки кістковий мозок представлений різними типами клітин, що знаходяться на різних стадіях диференціювання, то такі істотні відмінності за вмістом кальцію і міді можуть бути пов'язані з тим, що в кістковому мозку молодих і старих тварин містяться різні морфологічні типи клітин, які розрізняються за іонним складом. У зв'язку з цим, ми визначали 8 основних морфотипов (на них припадає 60 – 80 % всіх типів клітин кісткового мозку), – це

лімфоцити, паличкоядерні і сегментоядерні нейтрофіли, метаміелоцити, міелоцити, еозинофіли, базофіли і моноцити.

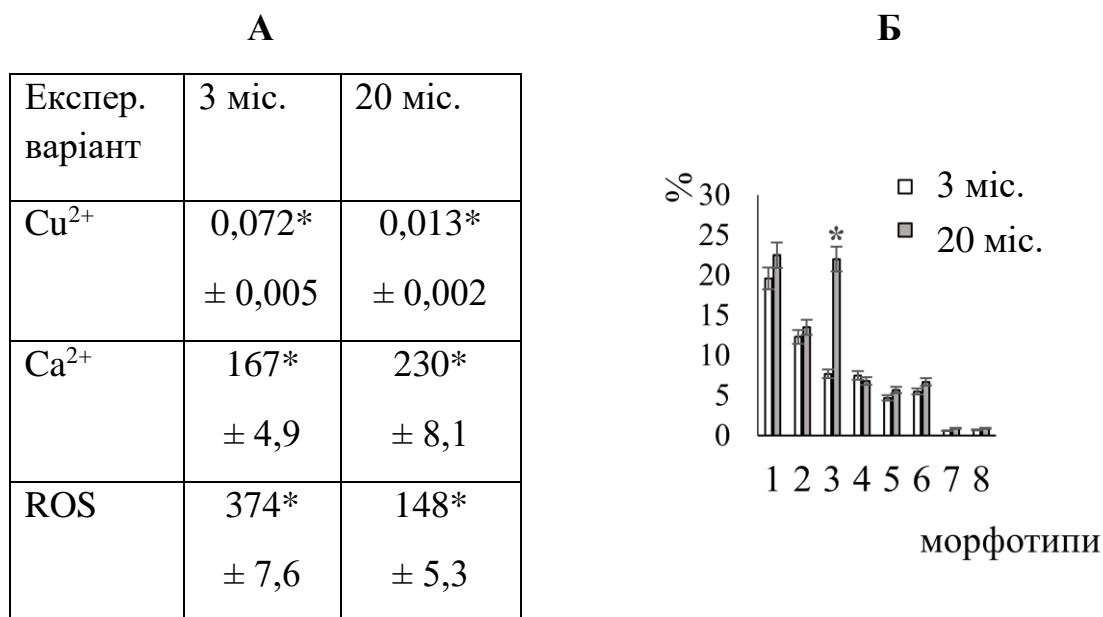


Рис. 3.7 Вміст іонів міді ( $\text{мкг}/10^6$  кл), іонів кальцію (ум. од.), вільних форм кисню (ROS) (усл. од.) у клітинах кісткового мозку (А), що отримані у інтактних молодих та старих тварин та деякі морфологічні типи клітин кісткового мозку інтактних молодих та старих тварин (Б): 1 – паличкоядерні нейтрофіли; 2 – метаміелоцити; 3 – лімфоцити; 4 – сегментоядерні нейтрофіли; 5 – міелоцити; 6 – еозинофіли; 7 – базофіли; 8 – моноцити. Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожну експериментальну групу,

\*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

Виявилося, що морфологічні типи клітин кісткового мозку молодих і старих тварин представлені в однаковій кількості, за винятком лімфоцитів, яких було в 2,8 рази більше у старих тварин, у порівнянні з молодими тваринами (Рис. 3.7). Отримані результати дозволяють стверджувати, що клітини кісткового мозку молодих і старих тварин мають різний іонний склад, і це не пов'язано з типами диференційованих клітин як у молодих, так і у старих тварин.

Як відомо, іонний склад клітини регулюється різними механізмами та

впливає на функціональну активність клітин кісткового мозку. Іони металів входять до складу великої кількості ферментів і регулюють їх активність [197], забезпечують внутрішньоклітинний сигналінг [198], регулюють внутрішньоклітинний транспорт, впливають на характеристики редокс-системи клітини. Необхідно відзначити, що зміна змісту одного з елементів, зокрема, кальцію веде до зміни змісту та інших іонів в клітині.

Отримані результати вказують на відмінності клітин кісткового мозку молодих і старих тварин за сумарним вмістом заряджених частинок, зокрема, іонного складу і, як наслідок, фізико - хімічних характеристик. Важливою фізико-хімічною характеристикою клітин є редокс-система, на показники якої може впливати і іонний склад в клітці. Для оцінки показників редокс-системи визначали вміст вільних форм кисню в клітинах кісткового мозку.

Вміст вільних форм кисню в клітинах кісткового мозку старих тварин було в 2,5 рази менше, ніж в клітинах кісткового мозку молодих тварин (Рис. 3.7). Ці результати дозволяють вважати, що рівновага в системі «прооксиданти - антиоксиданти» в клітинах кісткового мозку старих тварин зміщена в бік антиоксидантів, в той час, як в клітинах кісткового мозку молодих тварин воно зміщене в сторону прооксидантів.

Отже, одні й ті ж морфотипи клітин кісткового мозку, отримані у молодих і старих тварин, розрізнялися за іонним складом, вмісту вільних форм кисню, що може вказувати на їх функціональні відмінності.

Було висловлено припущення, що формування вікових відмінностей в клітинах кісткового мозку обумовлено віковими змінами характеристик мікрооточення [199]. Для перевірки цього, в наступній серії експериментів змінювали характер мікрооточення клітин кісткового мозку індукцією у молодих і старих тварин фіброзу печінки.

Отже, за результатами роботи, виявлено, що в кістковому мозку старих тварин було виявлено більшу кількість морфологічно ідентифікованих типів клітин кісткового мозку, на які доводилося більше 50 % від загальної кількості всіх типів клітин кісткового мозку. Крім того, в кістковому мозку старих тварин

було зменшено кількість морфологічно не ідентифікованих типів клітин, до яких відносять стовбурові та остаточно не диференційовані типи клітин.

Отже, кістковий мозок старих тварин відрізняється за якісними і кількісними характеристиками клітин. Ці відмінності можуть бути обумовлені змінами характеристик мікрооточення клітин кісткового мозку, яке визначається кількісними і якісними характеристиками крові старих і молодих тварин. Так як клітини кісткового, як і інші тканини організму, реагують не на один, а на весь комплекс надзвичайно складний комплекс факторів мікрооточення, визначили вплив зміни мікрооточення клітин кісткового мозку на моделі індукованого фіброзу печінки.

### **3.2 Дослідження вік – залежних характеристики клітин кісткового мозку в первинній культурі у тварин з індукованим фіброзом печінки (Cu– та CCL<sub>4</sub> –)**

#### **3.2.1 Дослідження деяких особливостей CCL<sub>4</sub> – індукованого та Cu – індукованого фіброзу печінки**

Дослідження впливу мікрооточення клітин кісткового мозку - дуже складне завдання з кількох причин. Мікрооточення клітин кісткового мозку забезпечується кровотворної системою, особливостями матриксу і рядом інших факторів, до яких відносять фізико-хімічні властивості крові, склад білків, цитокінів та інших з'єднань. Мікрооточення клітин кісткового мозку надзвичайно динамічне і, в даний час, не досліджене повною мірою, в зв'язку з цим його моделювання не представляється можливим. Крім того, клітини кісткового мозку, як і інші типи клітин організму, реагують не на окремі компоненти, а інтегрально на той баланс, який динамічно змінюється. Виходячи з цього, природною експериментальною моделлю для дослідження вплив мікрооточення на функціональні характеристики може служити зміна функціональних характеристик клітин печінки. По-перше, печінку надає

найбільший вплив на формування і динамічні характеристики компонентів крові. По-друге, патології печінки, які роблять сильний вплив на фізико-хімічні характеристики та склад крові, мають велике значення для людини, і дослідження впливу патологій печінки на функції клітин кісткового мозку мають велике практичне значення. І, нарешті, дослідження взаємовпливів кісткового мозку і печінки в онтогенезі і патогенезі мають велике значення в розумінні механізмів регуляції вік-залежних патологій, що важливо, як для інтегративної фізіології, так і для геронтології.

З метою зміни мікрооточення клітин кісткового мозку використовували прийом індукції фіброзу печінки двома різними індукторами – чотирьоххлористим вуглецем і сірчаною кислотою.

Відомо, що багаторазові послідовні введення експериментальним тваринам чотирьоххлористого вуглецю індукують фіброз печінки [200]. Було виявлено, що через 24 години після введення тваринам чотирьоххлористого вуглецю в дозі 0,1 мл на 100 г маси тіла активність аланінамінотрансферази в сироватці крові була збільшена на 200 % в порівнянні з контрольною групою тварин, а аспартатамінотрансферази – на 50 %, відповідно (Рис. 3.8). Зміст альбуміну залишалося незмінним у порівнянні з контролем (Рис. 3.8).

Ці зміни в печінці відбувалися на тлі 56 % збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів в сироватці крові (Рис. 3.8 А).

На тлі  $\text{CCl}_4$  – індукованого фіброзу печінки були виявлені вік-залежні зміни фагоцитарної активності. Так, фагоцитарний індекс (ФІ) у молодих тварин був знижений на 25 % в порівнянні з контролем, а фагоцитарне число (ФЧ) нічого не змінено у молодих тварин (Рис. 3.8 Б). У той же час, у старих тварин ФІ і ФЧ був знижений в порівнянні з відповідним віковим контролем на 36 і 37 %, відповідно (Рис. 3.8 Б).

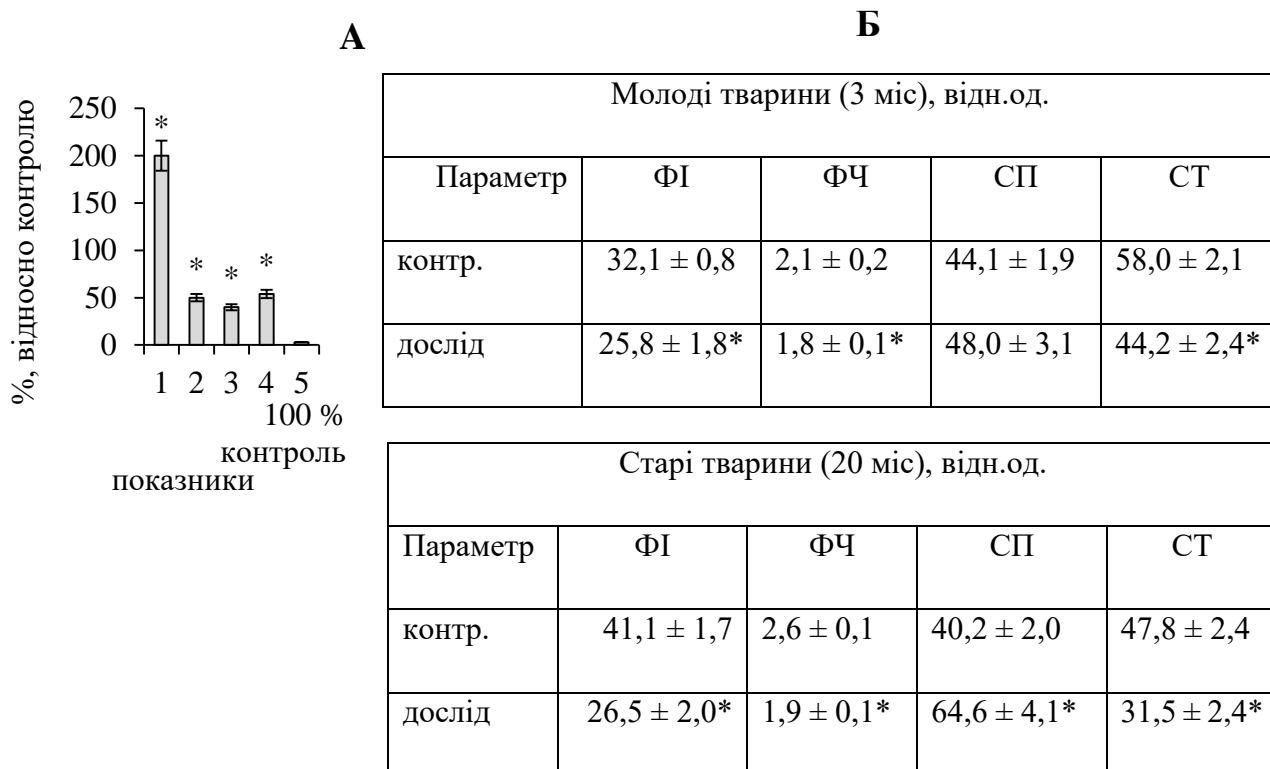


Рис. 3.8 Зміни, у відсотках по відношенню до контролю, який прийнятий за 100 %, активності аланінамінотрансферази (1), активності аспартатамінотрансферази (2), активності лужної фосфатази (3), вмісту гідроперекисей ліпідів (4) і вмісту альбуміну (5) в сироватці крові тварин (А) і фагоцитарного індексу (ФІ), фагоцитарного числа (ФЧ), спонтанного рівня (СП) та індукованої зимозаном (СТ) активності NADPH нейтрофілів в відносних одиницях після індукції фіброзу печінки чотирьоххлористим вуглецем у молодих і старих тварин (Б).

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожну експериментальну групу,  $* p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

Вихідний (визначався як спонтанний) рівень ферментативної активності нейтрофілів в НСТ – тесті у молодих тварин не відрізнявся від контролю, а стимульований зимозаном був знижений на 24 % (Рис. 3.8 Б). У той же час, у старих тварин вихідний рівень ферментативної активності був вище контролю

на 60 %, а стимульований – на 35 % нижче контролю (Рис. 3.8 Б).

Розвиток  $\text{CCl}_4$  – індукованого фіброзу печінки супроводжувалося генералізованими змінами, які зачіпали функції печінки, активність імунної системи і, як наслідок, зміна складу крові і редокс-системи організму. Ці зміни також будуть супроводжуватися вираженими стрибкоподібними змінами мікрооточення клітин кісткового мозку.

Отже, отримані результати і велику кількість наявних даних переконливо свідчать про зміну мікрооточення клітин кісткового мозку. При цьому, ці зміни мали вік-залежний характер, тобто вони були кількість помітні у молодих і старих тварин.

Відомо, що патології печінки, зокрема, фіброз печінки може бути індукований факторами різної хімічної природи, вірусами, а також продуктами харчування. Залишається остаточно невстановленим залежність між індукторами патології, особливостями перебігу патології та її впливу на інші системи організму. У зв'язку з цим, здавалося обґрунтованим моделювати фіброз печінки не тільки класичним токсикантом – чотирьоххлористим вуглецем, а й такими гепатотоксическими сполуками, як іони міді.

У наступній серії експериментів фіброз печінки індукували введенням іншого гепатотропного токсиканта – сірчаноокислої міді. Можна вважати, що при цьому в кістковому мозку буде формуватися інше, відмінне від  $\text{CCl}_4$  – індукованого фіброзу печінки, мікрооточення для клітин кісткового мозку.

Триразові послідовні введення сірчаноокислої міді тваринам в дозі 1 мг / 100 г маси тіла з інтервалами 48 годин між введеннями викликало як подібні, так і відмінні від чотирьоххлористого вуглецю зміни в функціональних і морфологічних показниках тварин. Так, активність аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази, а також зміст альбуміну у тварин з  $\text{Cu}$  – індукованим фіброзом печінки не змінювалося в порівнянні з контролем (Рис. 3.9 А).

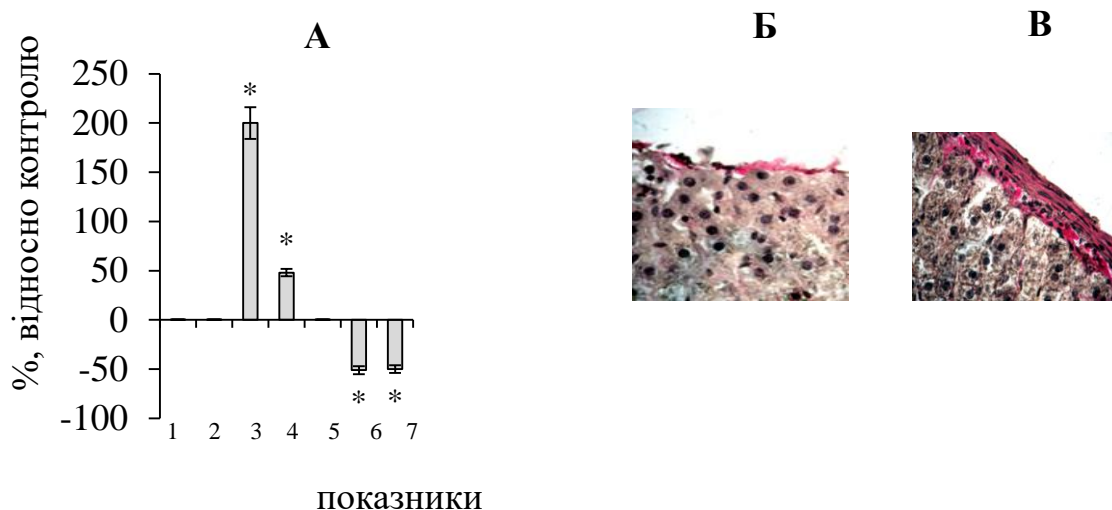


Рис. 3.9 Зміни активності в процентах по відношенню до контролю, який прийнятий за 100 %, активність аланінамінотрансферази (1), активність аспартатамінотрансферази (2), активність  $\gamma$  – глутамілтрансфераз (3), вміст гідроперекисів ліпідів (4) і вміст альбуміну (5) в сироватці крові тварин і фагоцитарний індекс (ФІ) (6), фагоцитарне число (ФЧ) (7) у відносних одиницях після індукції фіброзу печінки чотирьоххлористим вуглецем у молодих і старих тварин (а), а також гістологія печінки інтактних тварин (Б) і тварин після отримання сірчаноокислої міді (В). Мікрофотографії печінки контрольних і експериментальних тварин, фарбування по Ван Гизону,  $\times 100$

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожную експериментальну групу. \*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

Однак, в сироватці крові тварин, яким вводили сірчаноокислу мідь, активність  $\gamma$  – глутамілтрансферази, яка є показником токсичних впливів на печінку, збільшувалася на 200 % в порівнянні з контрольним рівнем (Рис. 3.9 А). При цьому вміст гідроперекисей ліпідів в сироватці було також збільшено на 50 % (Рис. 3.9 А). Фагоцитарна активність, яку характеризували по фагоцитарної індексу і фагоцитарного числа, була знижена в порівнянні з контрольним варіантом на 50 % (Рис. 3.9 А). Раніше нами було показано, що вміст колагену в паренхімі печінки тварин, які отримували сірчаноокислу мідь, було збільшено



після введення сірчаноокислої міді [201]. Таке збільшення вмісту колагену супроводжувалося зрощенням лопатей печінки в єдину структуру, що не виявлялося при  $\text{CCl}_4$  – індукованого фіброзу печінки. Гістологічний аналіз показав, що у таких тварин була істотно змінена організація капсули печінки, на відміну від контрольного варіанту (Рис. 3.9 Б). У капсулі присутні фагоцитарні клітини, що свідчить про запальний процес в печінці (Рис. 3.9 Б). Отже, багаторазові послідовні введення сірчаноокислої міді експериментальним тваринам супроводжувалося формуванням фіброзу печінки, який мав і суттєві відмінності з  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки.

Можна вважати, що індукція фіброзу печінки сірчаноокислої міддю також призводить до зміни фізико-хімічних характеристик крові і вони відрізняються від таких у разі  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки.

Звичайно, після введення в організм експериментальних тварин чотирьоххлористого вуглецю або іонів міді, вони можуть зробити безпосередній вплив на клітини кісткового мозку. Однак, як відомо, основною мішенню для цих з'єднань є печінку, і те, що при цьому буде змінюватися мікрооточення клітин кісткового мозку – сумнівів не викликає.

### **3.2.2 Дослідження паттерну морфотипів клітин кісткового мозку, отриманих у тварин з фіброзом печінки, в системі *in vivo***

Важливим питанням в дослідженні впливу характеристик мікрооточення на «поведінку» клітин кісткового мозку є спрямованість диференціювання стовбурових клітин кісткового мозку, а також швидкість цього процесу і швидкість транспорту клітин з кісткового мозку в кровоток. Інтегральним показником цих процесів в кістковому мозку може служити кількість зрілих - морфологічно ідентифікованих типів клітин.

Ідентифікація морфотипів клітин кісткового мозку – завдання досить складна і навіть використання популярних сьогодні CD–маркерів не завжди дає однозначну характеристику типів клітин. У даній роботі використовували

класичний візуальний мікроскопічний аналіз морфотипів клітин кісткового мозку [202]. При цьому визначали морфологічно ідентифікуються клітини: клітини–попередники – мієлоцити, метамієлоцити, а також паличкоядерні і сегментоядерні нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, базофіли і моноцити.

Всі клітини кісткового мозку нами були представлені як дві групи: морфологічно ідентифікованими (сума 8 зазначених ідентифікованих морфотипов) і морфологічно ідентифікованими морфотипами (сума стовбурових і комітованих клітин).

Такий поділ клітин кісткового мозку дозволяє відповісти на питання про швидкість дозрівання і транспорті зрілих клітин в кровоток при зміні мікрооточення.

Виявили: 1) що у старих інтактних тварин на частку морфологічно ідентифікованих морфотипів клітин кісткового мозку припадало понад 80 % від усіх клітин кісткового мозку, тоді як у молодих ця частка становила 60 % (Рис. 3.10 А, Б). Співвідношення ідентифікованих / не ідентифікуються (і / н) морфотипов у молодих тварин становило 1,5, а у старих – 3,8 (Рис. 3.10 В, Г); 2) наявність фіброзу печінки у молодих тварин незалежно від типу індуктора (Cu – або  $\text{CCl}_4$ ) супроводжувалося зменшенням кількості ідентифікованих і збільшення не ідентифікованих морфотипів клітин кісткового мозку (Рис. 3.10 А), що призводило до вірогідного зменшення співвідношення і / н типів у молодих тварин до 0,96-0,92 (Рис. 3.10 В, Рис. 3.11), клітини кісткового мозку старих тварин інакше реагували на індукцію фіброзу, і ця реакція була різною в разі Cu – індукованого фіброзу печінки та  $\text{CCl}_4$  – індукованого фіброзу печінки. Так, в разі Cu – індукованого фіброзу печінки збільшувалася кількість ідентифікованих морфотипов клітин (Рис. 3.10 Б), а співвідношення і / н типів доходило до 6,5 (Рис. 3.10 Г). У той же час, у разі  $\text{CCl}_4$  – індукованого фіброзу печінки кількість ідентифікованих і не ідентифікованих клітин не відрізнялося від інтактних старих тварин (Рис. 3.10 Г).

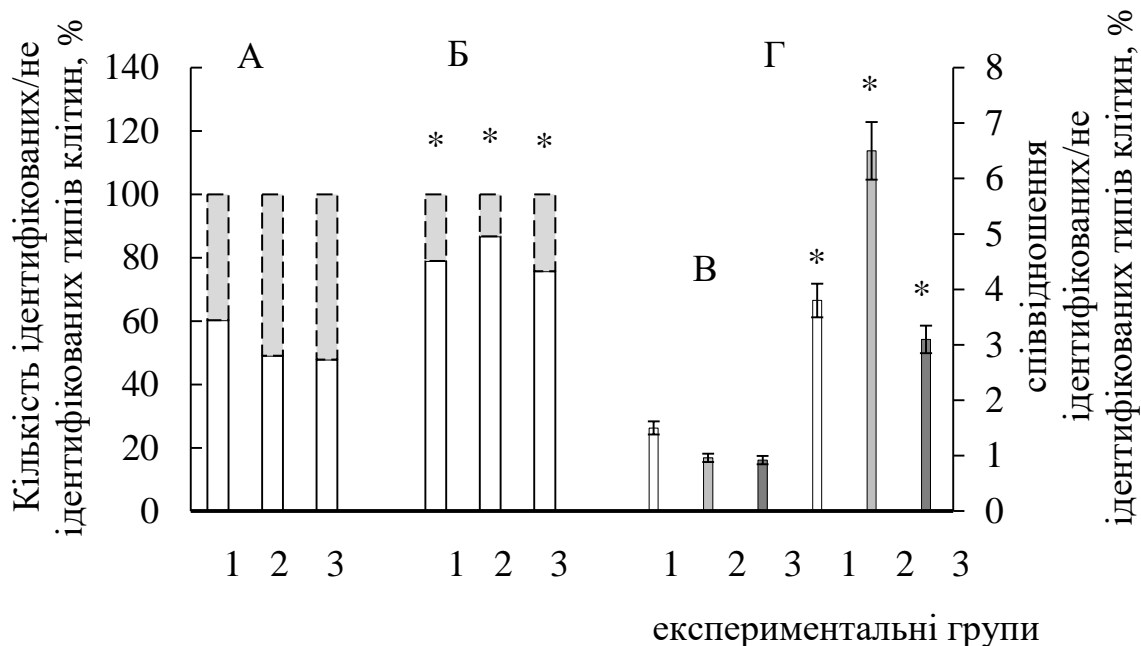


Рис. 3.10 Кількість морфологічно ідентифікованих морфотипів (□) та не ідентифікованих (■) у інтактних тварин (1), та тварин з Су – індукованим фіброзом печінки (2) и CCl<sub>4</sub> – індукованим фіброзом печінки (3), відповідно, у молодих тварин (А) та старих тварин (Б), а також співвідношення між ідентифікованими/не ідентифікованими типами клітин, відповідно, в цих же експериментальних групах для молодих (В) та старих (Г) тварин.

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожен експериментальну групу, \*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

Отже, наявність фіброзу печінки мало вплив на швидкість диференціювання і, можливо, «час затримки» диференційованих типів клітин в кістковому мозку. Це залежить як від віку тварин, так і від особливостей фіброзу, тобто характеру мікрооточення.

На наступному етапі роботи визначали патерн морфологічно зрілих типів клітин в кістковому мозку (Рис. 3.11).

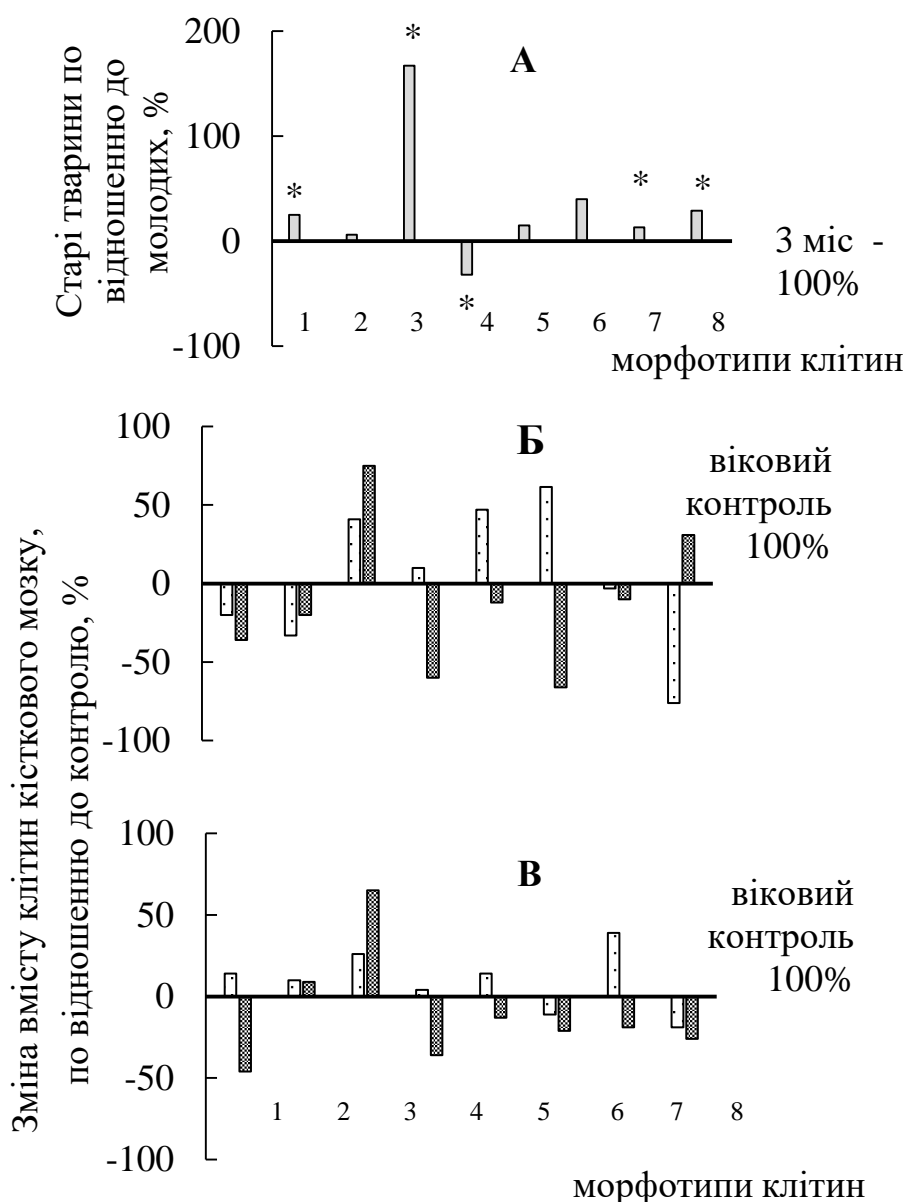


Рис. 3.11 Зміна кількості паличкоядерних нейтрофілів (1), метаміелоцитів (2), лімфоцитів (3), сегментоядерних нейтрофілів (4), міелоцитів (5), еозинофілів (6), базофілів (7), моноцитів (8) в процентах у старих інтактних тварин, в порівнянні з молодими, які прийняті за 100 % (А), зміна кількості цих типів клітин у молодих тварин (□) і, відповідно, у старих тварин (■) в разі Cu – індукованого фіброзу печінки (Б) та  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки (В) по відношенню до інтактним тваринам, відповідно, молодих і старих тварин, які прийняті за 100 %.

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожну експериментальну групу. \*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

У наступній серії експериментів визначали кількість морфологічно ідентифікованих морфотипов у молодих і старих тварин з  $\text{Cu}$  – індукованим фіброзом печінки (Рис. 3.11 Б) і, відповідно, з  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки (Рис. 3.11 В). Отримані результати дозволяють зробити кілька висновків: 1 – різні індуктори фіброзу печінки викликають різні зміни фізико-хімічних характеристик крові і, отже, мікрооточення клітин кісткового мозку, що супроводжувалося зміною кількості морфологічних типів в кістковому мозку порізного (Рис. 3. 11 Б, В), 2 – ці зміни, у порівнянні з контрольними тваринами, були більшою мірою виражені для  $\text{Cu}$  – індукованого фіброзу печінки, в порівнянні з  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки (Рис. 3.11Б, в), 3 – в разі  $\text{Cu}$  – індукованого фіброзу печінки мала місце різноспрямованість відповіді клітин кісткового мозку молодих і старих тварин (Рис. 3.11 Б, В).

Є дані про те, що зі збільшенням віку зменшується («вичерпується») пул стовбурових клітин [193]. Отримані дані про відносне зменшення кількості (до 10 %) недиференційованих клітин кісткового мозку у старих тварин, до склада яких входять мезенхімальні стовбурові клітини, може побічно підтверджувати ці дані. У зв'язку з цим, важливим є оцінка проліферативної активності клітин кісткового мозку, отриманих у молодих і старих тварин в системі *in vitro*. Крім того, культивування клітин *in vitro*, отриманих у тварин різного віку, дозволяє помістити клітини кісткового мозку в однакове мікрооточення та визначити їх, потенційно можливу, проліферативну активність.

### **3.2.3 Дослідження «тривалості життя» лімфоцитів, нейтрофілів та матеїсцитів, отриманих з кісткового мозку молодих та старих інтактних тварин та тварин з фіброзом печінки, у первинній культурі з 0 по 96 годину**

Як відомо, однією з найважливіших характеристик клітин і, зокрема, клітин крові є їх «тривалість життя». Цей показник залежить від великої кількості факторів, які можуть бути умовно ранжовані в такій послідовності: генетичні – епігенетичні особливості; функціональна активність, яка

визначається «вимогами організму» шляхом зміни сигналіngu в системі мікрооточення; дією токсичних факторів різної природи. Складність вирішення проблем, що стосуються механізмів регуляції тривалості життя клітин посилюється тим, що вони діють не окремо, а в сукупності. Таким чином, питання про формування інтегрального клітинної відповіді залишається не ясним.

Одним з підходів у вирішенні проблеми «тривалості життя» клітин є культивування клітин в первинній культурі, тобто до повного формування адаптивних модифікацій клітин до умов культивування *in vitro*. При такому підході можна судити про вплив епігенетичних – метаболічних особливостей клітин, яке сформувалося в певних умовах мікрооточення (вік-залежних, при розвитку патологій і ін.).

Як було показано, «тривалість життя» різних типів клітин кісткового мозку в первинній культурі, виділених у молодих і старих тварин, була різною.

Так, кількість лімфоцитів в культурі молодих інтактних тварин нічого не змінено процесі культивування (Рис. 3.12 А). У той же час кількість лімфоцитів, отриманих у старих тварин, після переведення їх в систему *in vitro*, збільшувалася на 72 % до 96 години культивування (Рис. 3.12). Це дозволяє вважати, що в процесі диференціювання клітин кісткового мозку відбувається при мікрооточенні, характерному для старих тварин, зачіпало різні епігенетичні та метаболічні ланки.

Отже, лімфоцити, отримані у інтактних старих тварин здатні ділитися в культурі, на відміну від лімфоцитів молодих тварин.

У тому випадку, якщо лімфоцити отримували у молодих тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки, то вони активно проліферували в системі *in vitro* (їх кількість збільшувалася на 47 % (Рис. 3.12 А)). Однак якщо вони були виділені у молодих тварин з CCl<sub>4</sub> – індукованим фіброзом печінки, то їх кількість незначна зменшувалася за 48 годин і в подальшому не змінювалося протягом 96 годин культивування, як і в інтактному контролі (Рис. 3.12 А).

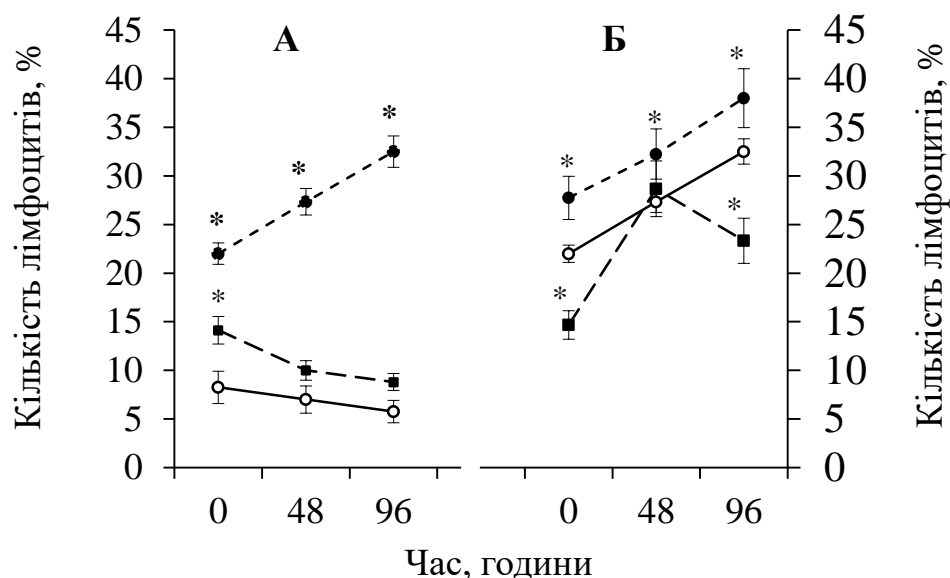


Рис. 3.12 Кількість лімфоцитів у первинній культурі, яка отримана з кісткового мозку інтактних 3 міс. (—○—) тварин, тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки (---●---) та тварин з CCl<sub>4</sub> – індукованим фіброзом печінки (---■---) (А), а також для 20 міс. тварин тих самих експериментальних груп (Б).

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожну експериментальну групу, \*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у контрольних тварин, за тестом Манна – Уїтні

Якщо лімфоцити виділяли у старих тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки, то їх кількість збільшувалася в процесі культивування, так само як лімфоцити молодих тварин (Рис. 3.12 В). Лімфоцити, отримані у старих тварин з CCl<sub>4</sub> – індукованим фіброзом печінки також проліферували, на відміну від молодих, і їх кількість збільшувалася на 96 % до 48 години культивування, а в подальшому їх кількість в культурі незначно зменшувалася (Рис. 3.12 Б).

Як відомо, лімфоцити відносяться до імунокомпетентних клітинам, утворюються в кістковому мозку зі стовбурної клітини [204]. У кістковому мозку містяться так звані «наївні» лімфоцити, які в організмі формують різні форми спеціалізованих клітин: Т-клітини (супресори; кілери, ефектори, хелпери і клітини пам'яті) В-клітини (хелпери, супресори, кілери) [205]. Тривалість життя

лімфоцитів в кров'яному руслі надзвичайно різноманітна, від декількох днів до декількох років [206]. Як відомо, високо диференційовані лімфоцити в культурі не проліферують.

Отже, мікрооточення клітин кісткового мозку, яке має вік-залежні особливості, впливає на метаболічний статус лімфоцитів, що може впливати на їх «тривалість життя» в первинній культурі і, можливо, в самому організмі. На ці характеристики і, як наслідок, «тривалість життя» клітин в культурі впливає і наявність фіброзу печінки. Це може пояснюватися складним характером взаємодій вихідного метаболічного стану (яке було різним у молодих і старих тварин) клітин зі зміненим мікрооточенням при індукції патологій.

Як відомо, нейтрофіли мають відносно коротку тривалість життя [207].

Кількість паличкоядерних нейтрофілів, одержаних у інтактних молодих тварин через 48 годин культивування *in vitro* зберігалася на рівні контролю, а до 96 години культивування їх кількість зменшилася на 36 % від вихідного рівня (Рис. 3.13 А).

У тому випадку, якщо сегментоядерні нейтрофіли отримували у молодих тварин з Су – індукованим фіброзом печінки та  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки, то їх «тривалість життя» в системі *in vitro* зменшувалася в 2 рази (Рис. 3.13 В). Якщо паличкоядерні нейтрофіли отримували у старих тварин, то їх кількість лінійно зменшувалася в процесі культивування (Рис. 3.13 Б). Однак оскільки їх кількість в культурі було початково великим, то до 96 години в культурі залишалося набагато більше клітин, ніж у молодих тварин (Рис. 3.13 Б).

Подібним чином змінювалося зміст сегментоядерних нейтрофілів в культурі (Рис. 3.13 В, Г).



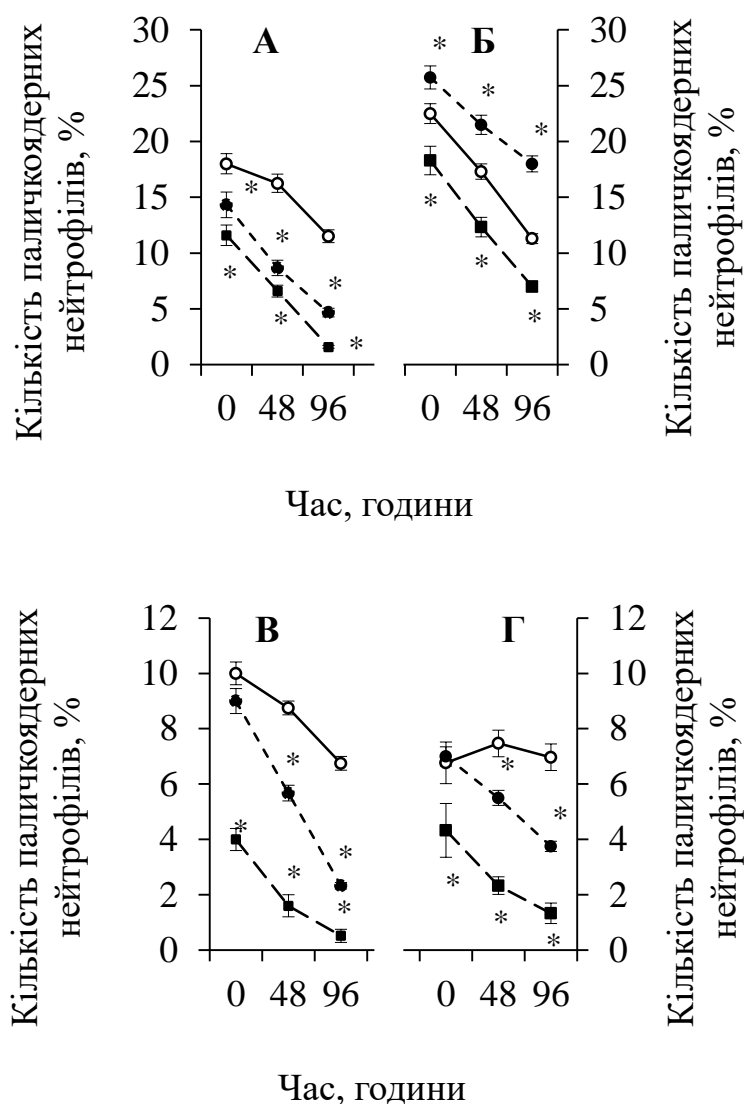


Рис. 3.13 Кількість паличкоядерних нейтрофілів (А) та сегментоядерних нейтрофілів (В) у первинній культурі, яка отримана з кісткового мозку інтактних 3 міс. (—○—) тварин, тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки (---●---) та тварин з CCl<sub>4</sub> – індукованим фіброзом печінки (---■---), а також для 20 міс. тварин тих самих експериментальних груп (Б, Г).

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожну експериментальну групу,  $* p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у контрольних тварин, за тестом Манна – Уїтні

Отже, «тривалість життя» в первинній культурі залежить від віку тварин і патологій печінки.

### 3.2.4 Дослідження впливу індукованого фіброзу печінки на інтенсивність росту клітин кісткового мозку у первинній культурі

Одним з найбільш біологічно значущих показників клітинної активності, поряд з «тривалістю життя» клітин, є здатність до поділу і його інтенсивність, тому що проліферативна активність є інтегральним результатом реакції клітин на «взаємодія» екзогенних і ендогенних факторів.

Для визначення проліферативної активності клітин кісткового мозку готували суспензію клітин кісткового мозку, отриманих у молодих і старих тварин так, щоб в 1 мл культуральної середовищі завжди містилося по 2 млн клітин, і визначали кількість клітин протягом 4 діб культивування. З метою перевірки впливу мікрооточення на активність клітин кісткового мозку їх отримували у молодих і старих тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки та  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки, після чого переводили їх в систему *in vitro*, тобто створювали однотипне мікрооточення.

Якщо клітини кісткового мозку були отримані у молодих тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки, то вони активно проліферували протягом першої доби культивування та їх кількість навіть перевищувало контроль в цей час (Рис. 3.14 Б). Після цього їх кількість залишалось незмінним протягом 4 діб культивування (Рис. 3.14 Б), і достовірно було меншим, ніж у випадку інтактного контролю (Рис. 3.14 А).

Отже, інгібуюча дія Cu – індукованого фіброзу печінки на активність клітин кісткового мозку в первинній культурі виявлялася через 2-4 доби, тобто було відстроченою. Це може пояснюватися непрямою дією екзогенних іонів міді, яку вводили в організм, а зміною мікрооточення клітин кісткового мозку і формуванням специфічних епігенетичних-метаболічних характеристик клітин, які сформувалися в процесі диференціювання на тлі зміненого мікрооточення.

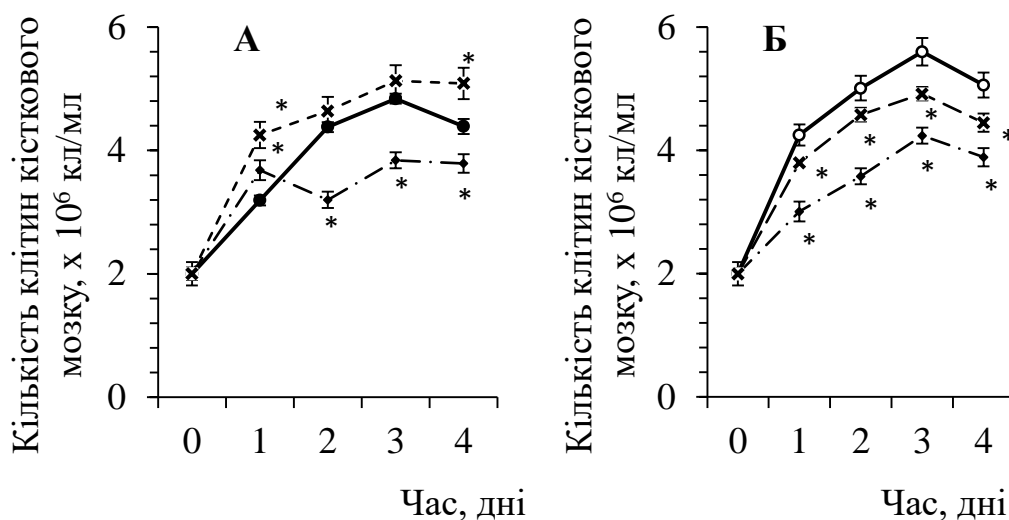


Рис. 3.14 Кількість клітин кісткового мозку з 1 по 4 добу культивування *in vitro*, що отримані у 3 міс. інтактних (—●—), тварин з Cu-індукованим (---★---), и CCl<sub>4</sub>-індукованим фіброзом печінки (···×···) (А), а також у 20 міс. інтактних тварин (—○—), тварин з Cu-індукованим (---★---), и CCl<sub>4</sub>-індукованим фіброзом печінки (···×···) (Б).

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожную експериментальну групу,  $* p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у контрольних тварин, за тестом Манна – Уїтні

У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку були отримані у молодих тварин з CCl<sub>4</sub> – індукованим фіброзом печінки, то їх кількість збільшувалася швидше, ніж в контрольному варіанті і чим у тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки (Рис. 3.14 Б). Отже, розвиток Cu – індукованого фіброзу печінки у молодих тварин супроводжувався такими епігенетичними і метаболічними змінами в клітинах кісткового мозку, які приводили до пригнічення проліферативної активності клітин кісткового мозку в системі *in vitro*, а при CCl<sub>4</sub> – індукованому фіброзі печінки навпаки збільшенням проліферативної активності клітин кісткового мозку в системі *in vitro*.

У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку були отримані у старих тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки, то клітини кісткового мозку

зберігали здатність до проліферації в системі *in vitro* протягом 4 діб культивування, хоча вона і поступалася контрольного варіанту (Рис. 3.14 Б). Якщо у старих тварин був індукований фіброз печінки введенням чотирьоххлористого вуглецю, то проліферативна активність мало відрізнялася від контролю (Рис. 3.14 В).

Отримані результати дозволяють припустити, що мало місце вік-залежний характер взаємовпливів вихідного стану клітин кісткового мозку зі зміненим мікрооточенням клітин кісткового мозку в результаті індукції фіброзу печінки. Клітини кісткового мозку старих тварин не втрачали здатність до проліферації на тлі фіброзу печінки, в той час, як це було характерно для клітин кісткового мозку молодих тварин.

Отже,  $\text{Cu}$  – індукований фіброз печінки надавав більш виражений ефект пригнічення проліферативної активності клітин кісткового мозку в культурі *in vitro* в порівнянні з  $\text{CCl}_4$  – індукованим фіброзом печінки, і мала виражений вік-залежний характер.

Таким чином, після перенесення клітин кісткового мозку, отриманих у інтактних тварин і тварин з фіброзом печінки, індукованим різними агентами, в однакову систему культивування, проліферативна активність була різною. Характер проліферативної активності залежав від віку тварин. Наявність фіброзу печінки викликало різні відповіді в клітинах кісткового мозку, в залежності від індуктора фіброзу та віку тварин. Проліферативна активність клітин кісткового мозку, отриманих у старих тварин з фіброзом печінки, перевершувала таку молодих тварин, як і в випадку інтактного контролю.

### **3.2.5 Дослідження впливу іонів екзогенної міді на інтенсивність росту культур клітин кісткового мозку молодих та старих тварин, та тварин з фіброзом печінки**

Так як зміна характеристик клітин кісткового мозку після індукції фіброзу печінки введенням тваринам чотирьоххлористого вуглецю або іонів міді, не

можна виключати прямого впливу цих токсикантів на клітини кісткового мозку, то в наступній серії експериментів визначали вплив іонів міді, яку вносили безпосередньо в культуру клітин *in vitro*, при цьому в одному випадку клітини були виділені у інтактних тварин, а в іншому випадку клітини були виділені у тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки молодих і, відповідно, старих тварин.

Такий експериментальний підхід дозволить відповісти на такі питання: 1 – змінюється чи відповідна реакція клітин кісткового мозку в культурі на дію екзогенних іонів міді (токсикантів) в залежності від вихідного стану клітин (інтактні тварини і тварини з фіброзом); 2 – чи існує вік-залежний характер відповіді на екзогенне вплив іонів міді? і, нарешті, 3 – чи можна використовувати такий експериментальний підхід для оцінки інтегрального стану клітин кісткового мозку?

Виявилося, що якщо клітини кісткового мозку для подальшого культивування отримані у інтактних 3 міс. тварин і в таку культуру вносили 4 мМ екзогенної сірчаноокислої міді, то через 1 і 2 доби кількість клітин нічого не змінено, у порівнянні з початковим числом ( $2 \times 10^6$  кл / мл), тобто культура не росла (Рис. 3.15 А).

Однак на 3-ю добу їх кількість збільшувалася в порівнянні з початковою кількістю на 70 % і не відрізнялася від контрольної культури, тобто без внесення екзогенної міді (Рис. 3.15 А). У тому випадку, якщо в культуру вносили 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , то кількість клітин з 1-ї по 4-у добу, залишалося постійним і становило близько  $2 \times 10^6$  кл / мл (Рис. 3.15 А).

Збереження кількості клітин на незмінному рівні з 1-ї по 4-у добу культивування можна пояснюватися тим, що іони міді інгібували метаболізм так, що клітини «виходили» з клітинного циклу, тобто не проліферували і не гинули, або ж кількість загиблих клітин відповідала кількості клітин, що знову з'явилися в результаті проліферації.

Оцінку життєздатності клітин в культурі проводили в тесті з трипановим синім. Було виявлено, що якщо у вихідній суспензії життєздатність клітин

становила 96-98 %, то до 4-ї доби вона складала  $75 \pm 1,2$  %. Отже, мала місце загибель клітин в первинній культурі в присутності іонів міді.

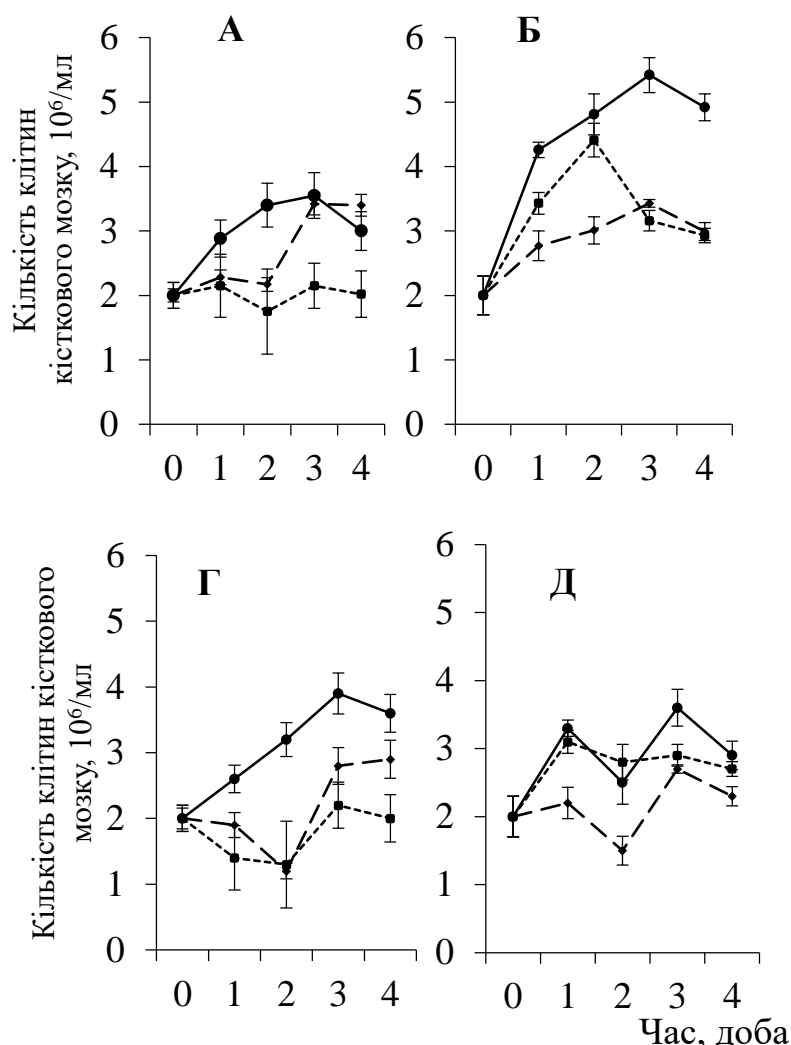


Рис. 3.15 Кількість клітин кісткового мозку в первинній культурі, виділеної у 3 міс. інтактних щурів (А) і 20 міс. щурів (Б), а також щурів з Cu – індукованим фіброзом печінки, відповідно, 3 міс. (В) і 20 міс. (Г), без внесення іонів міді в культуру (— $\bullet$ —), після внесення 4 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (--- $\blacksquare$ ---) і 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (..... $\blacktriangle$ .....) на початку культивування

Внесення в культуру клітин 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  супроводжувалося незначним (до 10 %) збільшенням нежиттєздатних клітин. Це дозволяє вважати, що після внесення іонів міді в культуру клітин можуть мати місце обидва механізми дії. Остаточне рішення цього питання вимагає спеціальних

експериментальних досліджень.

У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку виділяли у 20 міс. інтактних тварин і вносили в культуру 4 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , то їх кількість вже на 1-у, 2-у добу культивування була збільшена на 38, 50 і 71 %, в порівнянні з їх вихідною кількістю (Рис. 3.15 Б).

Після внесення 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  в культуру клітин, отриманих у 20 міс. тварин, спостерігався парадоксальний ефект в інтенсивності росту, в порівнянні з 4 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , і в порівнянні з такою ж дозою для клітин кісткового мозку, виділених у 3 міс. тварин (Рис. 3.15 А, Б).

Так, після внесення 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , їх кількість на 1-у добу збільшувалася на 71 %, на 3-ю добу - на 112 %, і не відрізнялися від кількості клітин, отриманих у інтактних тварин без внесення іонів міді (Рис. 3.15 Б). Тобто іони міді в даному випадку не інгібували зростання культури, як у молодих тварин, однак на 3-й і 4-у добу їх кількість зменшилася і не відрізнялося від кількості клітин кісткового мозку після внесення в культуру 4 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (Рис. 3.15 Б), тобто мало місце «запізнювання» в прояві токсичного ефекту міді, в разі клітин кісткового мозку старих тварин.

Отже, після внесення іонів міді виявляється дозо-залежна відповідь культури клітин кісткового мозку, яка була різною для культури клітин, отриманих у молодих і старих тварин.

У наступній серії експериментів визначали вплив екзогенної міді, яку вносили в культури клітин молодих і старих тварин з  $\text{Cu}$  – індукованим фіброзом печінки. Виявилося, що якщо в культуру клітин кісткового мозку, виділених у молодих тварин з  $\text{Cu}$  – індукованим фіброзом печінки, вносили 4 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\O$ , то кількість клітин в культурі зменшувалася на 5 і 40 % на 1-у і 2-у добу культивування в порівнянні з їх вихідною кількістю. Через 2-у добу кількість клітин збільшувалася на 40 %, в порівнянні з початковою кількістю на 3-ю добу і залишалася в такій же кількості на 4 добу (Рис. 3.15 Б). Таке збільшення проліферативної активності після 2-х діб культивування зростання в культурі в разі отримання клітин кісткового мозку у тварин з  $\text{Cu}$  – індукованим

фіброзом печінки може пояснюватися проявом гормезисного ефекту.

Якщо в цю культуру клітин вносили 8 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , то на 1 добу культивування кількість клітин зменшилася на 30 % (Рис. 3.15 Б).

У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку виділяли у старих тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки, і до них вносили 8 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , то кількість клітин зменшувалася на 2 добу та починало рости до 3 діб, в подальшому достовірно не змінювалося, тобто відсоток інгібування росту культури був виражений в меншій мірі, ніж у молодих тварин (Рис. 3.3 Г).

Після внесення в культуру клітин кісткового мозку старих тварин 4 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  спостерігалось збільшення кількості клітин на 1-у добу на 55 % від початкового значення і в надалі залишалось на одному рівні до 4-ї доби, тобто 4 mM надавали менший ефект інгібування, ніж 8 mM, як і для клітин інтактних тварин (Рис. 3.15 Б, Г). Отже, вік-залежний характер відповідної реакції клітин кісткового мозку на сірчаноокислу мідь зберігався незалежно від стану організму. У той же час, ефект інгібування ендогенної міді проліферативних процесів в клітинах кісткового мозку, виділених у тварин з фіброзом печінки, був виражений більшою мірою, ніж в разі виділення клітин кісткового мозку у інтактних тварин.

Отже, на тлі Cu – індукованого фіброзу печінки мало місце зміна мікрооточення клітин кісткового мозку, а не прямий вплив іонів міді на культуру клітин кісткового мозку. Клітини кісткового мозку, отримані у старих тварин, проявляли більшу стійкість у порівнянні з клітинами кісткового мозку молодих тварин до екзогенних іонів міді, і їх відповідь відрізнялась від відповіді за проліферативною активністю молодих тварин.

Отже, Cu – індукований фіброз печінки та  $\text{CCl}_4$  – індукований фіброз печінки викликали різні біохімічні і імунологічні перебудови в організмі експериментальних тварин, що супроводжувалося змінами в характеристиці клітин кісткового мозку. На тлі різних видів фіброзу відбувалися вік-залежні зміни в співвідношенні морфологічно ідентифікованих / не ідентифікованих типів клітин кісткового мозку. Ці результати можуть бути інтерпретовані як



вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на швидкість і спрямованість диференціювання клітин кісткового мозку. На характер відповіді клітин кісткового мозку на наявність індукованого фіброзу печінки впливає вік тварин, а точніше вже сформувалися, в процесі онтогенезу, характеристики клітин кісткового мозку. Зміна характеристик клітин кісткового мозку впливає на тривалість життя клітин в первинній культурі і їх проліферативну активність. Клітини кісткового мозку, отримані у старих тварин, проявляли більшу стійкість до токсичної дії екзогенних іонів міді, ніж клітини кісткового мозку, отримані у молодих тварин. Для клітин кісткового мозку молодих тварин було характерно дозозалежне пригнічення проліферативної активності в культурі, тоді як для клітин кісткового мозку мало місце зворотна дозова залежність в діапазоні концентрацій 4 – 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ .

### **3.3 Дослідження впливу вік-залежного впливу комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на деякі характеристики клітин кісткового мозку з Cu-індукованим фіброзом печінки**

#### **3.3.1 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на патерн морфотипів клітин кісткового мозку**

Відомо, що молозиво має унікальний склад різноманітних біологічно активних сполук [208-212] і використовується при лікуванні хвороби Альцгеймера, розсіяного склерозу, хвороби Крона, ревматоїдного артрити та інші патології [213-216].

Поряд з цим, в ньому містяться так звані «важкі» імуноглобуліни, які викликають алергічні реакції [217].

Ідея експерименту полягала в тому, що окислювальний стрес, який запускається екзогенними іонами міді в печінці, виконує роль системоутворюючого фактора адаптивних реакцій організму. Це проявляється у

швидкій перебудові редокс-системи всього організму, в тому числі, і кісткового мозку. Зміни мікрооточення в кістковому мозку супроводжуються змінами в швидкості проліферації клітин і напрямі їх диференціювання. Такі індуковані зміни в кістковому мозку сприяють відновленню пригнічених функцій печінки.

Можна вважати, що, якщо видалити жири та високомолекулярні білки, що містяться в молозиві, то його низькомолекулярні компоненти можуть вплинути на розвиток фіброзу печінки і поведінку клітин кісткового мозку у тварин з фіброзом печінки.

Так як компоненти молозива мають антиоксидантні ефекти і здатні усувати патологічні прояви фіброзу, як було показано в нашій лабораторії, тому становить інтерес зрозуміти, як за такої метаболічної ситуації будуть себе вести клітини кісткового мозку, в порівнянні з інтактними тваринами і тваринами з фіброзом печінки. Така, досить складна експериментальна постановка дозволяє відповісти на важливе питання – як змінюється здатність клітин кісткового мозку до проліферації і час життя клітин кісткового мозку в первинній культурі за фіброзу печінки і після його усунення компонентами молозива.

В кістковому мозку інтактної групи тварин містилося близько 18 % паличкоядерних нейтрофілів, 10 % метамієлоцитів, близько 8 % лімфоцитів, сегментоядерних нейтрофілів більше 6%, майже стільки ж мієлоцитів і еозинофілів і невелика кількість 0,65 % базофілів і 0,55 % моноцитів (Рис. 3.16).

За наявності Cu-індукованого фіброзу печінки в кістковому мозку збільшувалась кількість лімфоцитів та нейтрофілів порівняно з інтактним контролем (Рис. 3.16 А). За триразового послідовного введення тваринам з фіброзом печінки НКМ *per os* кількість лімфоцитів та нейтрофілів не відрізнялася від інтактного контролю, у них був декілька зменшеним вміст еозинофілів (Рис. 3.16 А).

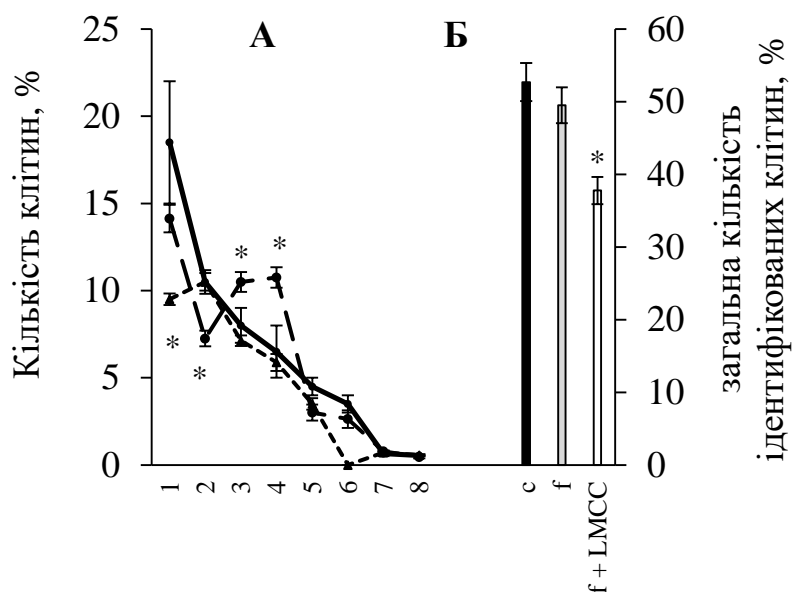


Рис. 3.16 Вміст різних типів клітин кісткового мозку на момент отримання клітинної суспензії (А), в тому випадку, якщо вони були виділені у інтактних тварин (—); у тварин з фіброзом (—•—) та тварин з фіброзом, які додатково отримували низькомолекулярні компоненти з інтервалом 24 години тричі *per os* в дозі 0, 1 г / 100 г маси тіла *in vivo* (----), і сума ідентифікованих типів клітин (Б) на осі: 1 – паличкоядерні нейтрофіли, 2 – метамієлоцити, 3 – лімфоцити, 4 – нейтрофіли сегментоядерні, 5 – мієлоцити, 6 – еозинофіли, 7 – базофіли, 8 – моноцити.

\* – при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

Як відмічалось, в кістковому мозку молодих інтактних тварин на 8 морфологічно ідентифікованих типів клітин доводилося більш 50 % всіх клітин кісткового мозку. В цієї серії на них доводилося 53 %, а на неідентифіковані (морфологічно незрілі) типи – 47 % (Рис. 3.16 Б). За розвитку фіброзу кількість ідентифікованих клітин незначно зменшувалася до 49 %, а після введення таким тваринам НКМ їх кількість складала тільки 35 % (Рис. 3.16 Б). Необхідно зазначити, що загальна кількість клітин в кістковому мозку у таких тварин не відрізнялася від контролю, тобто змінювалося співвідношення ідентифікованих /неідентифікованих в бік неідентифікованих клітин.

Отримані результати свідчать про те, що НКМ є багатими на біологічно

активні речовини, а також впливають на характеристики мікрооточення клітин кісткового мозку. Це супроводжувалося, з одного боку, «приведенням в норму» кількості лімфоцитів, нейтрофілів та еозинофілів, зменшенням еозинофілів, що було пов'язано зі збільшенням швидкості транспорту зрілих клітин (лімфоцитів та нейтрофілів, еозинофілів до кровотока).

Отримані результати дозволяють вважати, що ці зміни можуть супроводжуватися також змінами характеристик та властивостей клітин кісткового мозку, зокрема таких показників, як тривалість життя та проліферативна активність клітин.

В наступній серії експериментів визначали тривалість життя клітин кісткового мозку, отриманих у інтактних 3-місячних тварин, тварин з Су-індукованих фіброзом, у тварин з фіброзом, яким вводили триразово НКМ *per os*.

### **3.3.2 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на «тривалість життя» лімфоцитів в культурі *in vitro***

Як відомо, лімфоцити належать до імунокомпетентних клітин; утворюються в кістковому мозку зі стовбурової клітини [218]. У кістковому мозку містяться так звані «наївні» лімфоцити, які в організмі формують різні форми спеціалізованих клітин: Т-клітини (супресори, кілери, ефектори, хелпери і клітини пам'яті) В-клітини (хелпери, супресори, кілери) [219]. Тривалість життя лімфоцитів в кров'яному руслі надзвичайно різноманітна, від декількох днів до декількох років [220]. Як відомо, високодиференційовані лімфоцити в культурі не проліферують.

Початкова кількість лімфоцитів в культурі протягом 96 годин інкубації залишалась постійною, якщо вони були виділені у інтактних тварин (Рис. 3.17).

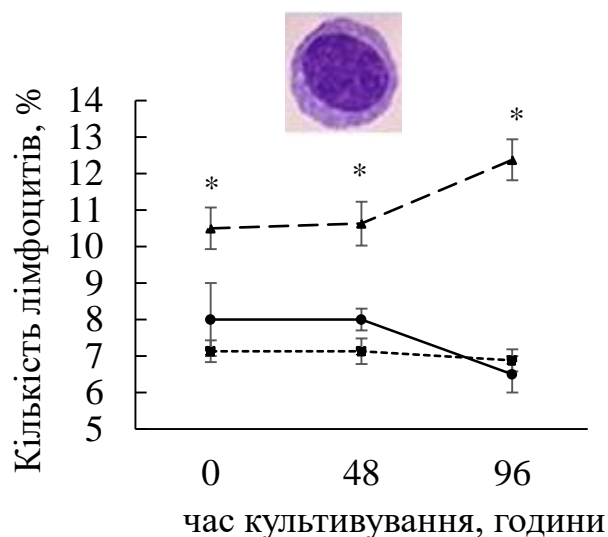


Рис. 3.17 Кількість лімфоцитів в процесі культивування (0 – 96 год.) *in vitro*, які були виділені з кісткового мозку інтактних 3 міс. тварин (—●—), тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки (---■---) і з Cu – індукованим фіброзом печінки, які отримували низькомолекулярні компоненти молозива з інтервалом 24 години тричі *per os* в дозі 0,1 г / 100 г маси тіла *in vivo* (---▲---)

\* – при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

Отже, лімфоцити, виділені з кісткового мозку інтактних тварин, зберігаються в первинній культурі не менше 4 діб.

Кількість лімфоцитів в кістковому мозку у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки була значуще вище, ніж у інтактного контролю, як було показано раніше. Перенесення цих лімфоцитів в культуру показало, що їх кількість залишалась такою ж високою протягом усього періоду інкубації, більш того їх кількість навіть незначно збільшувалась на 96 годину (Рис. 3.17).

Разом з тим, якщо вміст лімфоцитів в кістковому мозку у тварин з фіброзом був на 31% більше ніж у інтактного контролю, то після 96 годинного культивування, ці відмінності становили вже 90 % на «користь» фіброзу (Рис. 3.17); тобто в процесі культивування змінювалося співвідношення між типами клітин, отриманими у різних експериментальних груп, в первинній

культури, що свідчить про відмінності в тривалості життя.

Це дає підстави вважати, що «поведінка» в культурі лімфоцитів, виділених у інтактних тварин і у тварин з Су – індукованим фіброзом печінки, була різною, як було показано раніше. Ці відмінності в «поведінці» лімфоцитів в культурі можуть бути пов'язані з епігенетичними змінами в клітинах мозку на тлі розвитку фіброзу печінки або з тим, що в кістковому мозку у тварин з фіброзом печінки містилося більше «наївних» форм лімфоцитів, які здатні проліферувати в системі *in vitro*.

У тому випадку, якщо тварини з фіброзом печінки додатково отримували низькомолекулярні компоненти молозива, вміст лімфоцитів в кістковому мозку і характер їх поведінки в культурі не відрізнялися від інтактного контролю (Рис. 3.17).

Отже, якщо розвиток фіброзу індукує, принаймні, потенційну імунну відповідь організму, судячи з кількості лімфоцитів, то введення низькомолекулярних компонентів молозива тваринам з фіброзом усуває цей ефект. Або ж низькомолекулярні компоненти молозива забезпечували захист організму від токсиканта, що проявлялося в нормалізації кількості лімфоцитів в кістковому мозку.

### **3.3.3 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на «тривалість життя» нейтрофілів в культурі *in vitro***

Нейтрофіли – це найбільш чисельна група клітин серед лейкоцитів. Дозрівання нейтрофілів відбувається в кістковому мозку зі стовбурових клітин, які проходять стадії: промієлоцит → мієлоцит → метамієлоцит → паличкоядерний нейтрофіл. Як відомо, час напівжиття нейтрофілів в кров'яному руслі від 6 годин до 2-3 діб [221]. Як уже зазначалося, вміст мієлоцитів в кістковому мозку у тварин з фіброзом печінки був на 34 % менше, в порівнянні з інтактним контролем; додаткове введення цим тваринам низькомолекулярних компонентів молозива не впливало на їх підтримання, в порівнянні з фіброзом

(Рис. 3.18 А) (нульова точка на вісі).

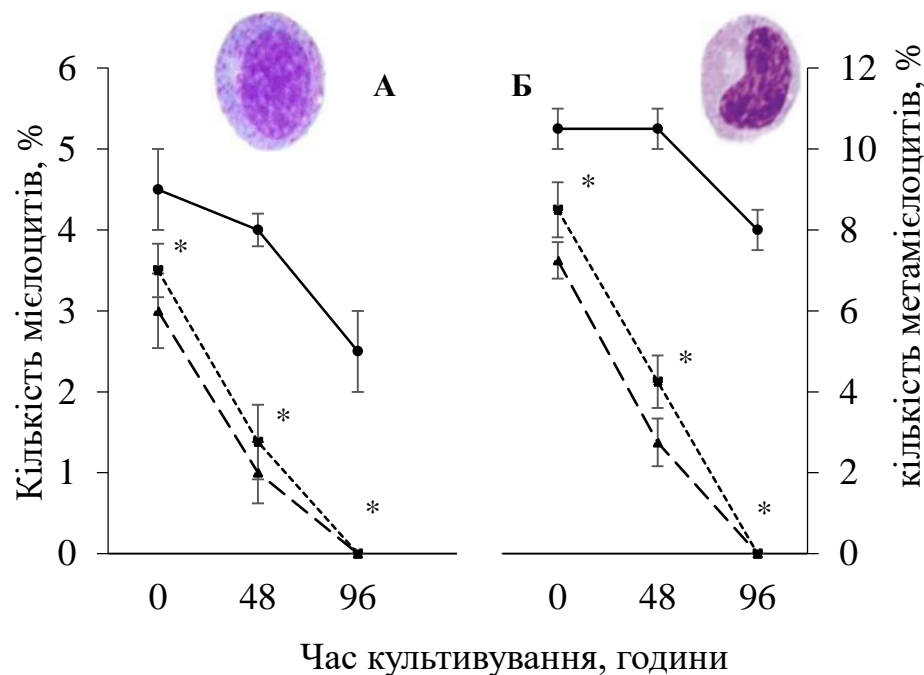


Рис. 3.18 Кількість мієлоцитів (А) і метамієлоцитів (Б) в процесі культивування *in vitro*, які були виділені з кісткового мозку інтактних 3-міс. тварин (—●—), тварин з Си-індукованим фіброзом печінки (---▲---) і з Си – індукованим фіброзом печінки, які отримували з інтервалом 24 години тричі низькомолекулярні компоненти молозива *per os* в дозі 0,1 г / 100 г. маси тіла *in vivo* (---■---).

\* - при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

Якщо кількість мієлоцитів, які були виділені у інтактних тварин залишалась незмінною протягом 48 годин культивування, а до 96 години їх кількість зменшувалася тільки на 45 % в порівнянні з початковим числом (Рис. 3.18). В такому випадку, якщо мієлоцити були виділені у тварин з фіброзом, їх кількість через 48 годин культивування була на 67 % менше вихідного рівня, а через 96 годин вони були відсутні в культурі, тобто за цей час вони всі руйнувалися (Рис. 3.18). Отже, «тривалість життя» мієлоцитів, виділених у тварин з фіброзом, була в кілька разів коротша, ніж у мієлоцитів, виділених у інтактних тварин.

Введення тваринам з фіброзом печінки низькомолекулярних компонентів молозива не впливало на швидкість загибелі мієлоцитів в культурі, в порівнянні з фіброзом (Рис. 3.18 А).

Отже, на тлі фіброзу відбувалися такі, найімовірніше, епігенетичні зміни в мієлоцитах (тобто на ранній стадії диференціювання стовбурових клітин) що не забезпечують «виживання» в культурі, на відміну від таких у інтактних тварин при культивуванні на середовищі 199 з 20 % інактивованою фетальною телячою сироваткою. Низькомолекулярні компоненти молозива не впливали на тривалість життя мієлоцитів в культурі.

Наступною стадією диференціювання лейкоцитів в кістковому мозку є метамієлоцит.

Визначення їх кількості через 48 годин культивування, якщо вони були виділені у інтактних тварин, так само показало збереження їх кількості незмінним, а на 96 годину їх кількість зменшувалася тільки на 24 % від початкової, тобто динаміка їх вмісту в культурі була подібна до мієлоцитів (Рис. 3.18 Б).

В той же час, швидкість зменшення кількості метамієлоцитів в культурі, виділених у тварин з фіброзом печінки, була лінійною, і через 48 годин їх кількість була на 63 % менше, а на 96 годину вони не зникали в культурі, тобто повністю руйнувалися (Рис. 3.18 Б).

Подібний характер «поведінки» в культурі спостерігали і для паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів (Рис. 3.19).

Так, вміст паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, отриманих з кісткового мозку інтактних тварин, значуще не змінювався, в порівнянні з початковою кількістю протягом 96 годин культивування (Рис. 3.1.19).

Введення тваринам з фіброзом низькомолекулярних компонентів молозива навіть збільшувало швидкість зменшення кількості паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів в культурі в порівнянні з фіброзом (Рис. 3.19).

В той же час, вміст нейтрофілів, виділених у тварин з фіброзом, майже лінійно зменшувався в процесі культивування і на 96 годину вони були відсутні



в культурі (Рис. 3.19). Введення тваринам з фіброзом додатково низькомолекулярних компонентів молозива супроводжувалося значущим зменшенням вмісту паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів в кістковому мозку, а їх культивування супроводжувалося ще більшою швидкістю загибелі, в порівнянні з такими, отриманих у тварин з фіброзом (Рис. 3.19).

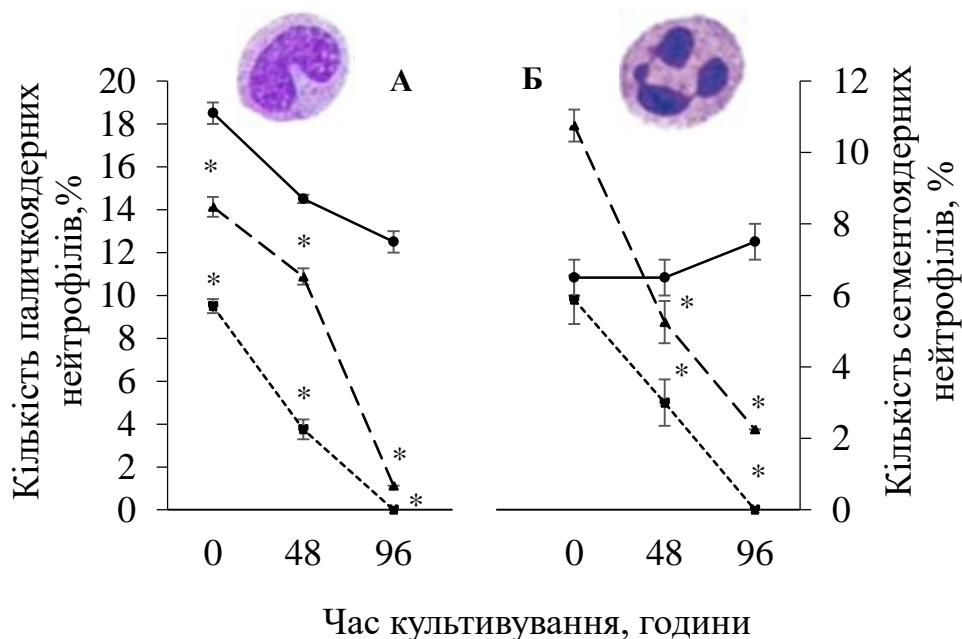


Рис. 3.19 Кількість паличкоядерних (А) і сегментоядерних (Б) нейтрофілів в процесі культивування *in vitro*, які були виділені з кісткового мозку інтактних 3 міс. тварин (—●—), тварин з Cu – індукованим фіброзом печінки (---▲---) і з Cu – індукованим фіброзом печінки, які отримували низькомолекулярні компоненти молозива з інтервалом 24 години тричі *per os* в дозі 0,1 г / 100 г маси тіла *in vivo* (····■····). \* – при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

Отже, триразове послідовне введення НКМ *per os* тваринам з фіброзом печінки впливало на їх характеристики, що проявлялося в збільшенні швидкості деградації клітин кісткового мозку в первинній культурі.

### 3.3.4. Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на зміну кількості клітин кісткового мозку у первинній культурі

Як було показано раніше, інтенсивність проліферації клітин є однією з найбільш інтегративних характеристик клітин для оцінки впливу різних чинників. Як було показано в попередньому розділі, загальна кількість клітин кісткового мозку, виділених у інтактних 3 місячних тварин, збільшувалася в культурі майже лінійно з перших по четверту добу росту (Рис. 3.20).

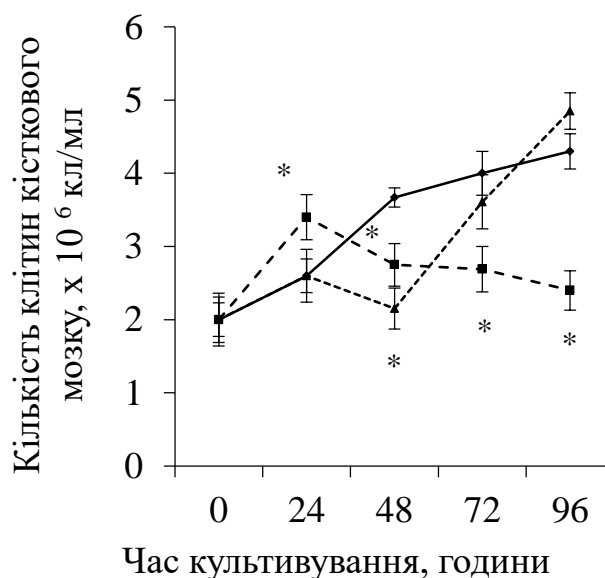


Рис. 3.20 Кількість клітин кісткового мозку при культивуванні їх в системі *in vitro* до 96 годин на середовищі 199 з 20 % фетальною телячою сироваткою. Клітини, отримані у інтактних тварин (—◆—), у тварин з Cu –індукованим фіброзом печінки (—■—), у тварин з Cu – індукованим фіброзом після введення їм низькомолекулярних компонентів молозива тричі з інтервалами 24 години (—▲—).

\* – при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

Необхідно відзначити, що на середовищі 199 з 20 % сироваткою крові клітини, хоча і не дуже інтенсивно росли, проте їх кількість збільшувалися в

кількості за 96 годин в 2,0 – 2,5 рази (Рис. 3.20).

У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку були виділені у тварин з Си-індукованим фіброзом печінки, інтенсивність їх проліферації в перші 24 години культивування була більш інтенсивною, ніж у клітин кісткового мозку контрольних тварин. Однак, в подальшому, їх кількість зменшувалася і залишалася незмінною протягом 96 годин (тобто вони не ділилися), так що на 96 годину їх кількість була в 2 рази менше інтактного контролю (Рис. 3.20).

Іншу, ніж у інтактного контролю і фіброзу, динаміку кількості клітин кісткового мозку в культурі спостерігали для варіанту фіброзу з подальшим введенням низькомолекулярних компонентів молозива (Рис. 3.20).

Так, в перші 24 години культивування їх кількість не відрізнялася від інтактного контролю. До 48 години вони відставали від контролю і не відрізнялися від варіанту фіброзу, в подальшому їх кількість різко збільшувалася (майже в 2,5 рази) і значуще не відрізнялася або навіть перевищувала інтактний контроль на 96 годину культивування (Рис. 3.20).

Отже, динаміка кількості клітин у всіх трьох експериментальних варіантів була різною: для інтактного контролю – повільне зростання; для фіброзу – зростання з «загасанням», а для фіброзу з введенням низькомолекулярних компонентів молозива – тривалим 48 годинним «лаг-періодом» і інтенсивним зростанням з 48 до 96 години. Така різна динаміка кількості клітин кісткового мозку в культурі, виділених у тварин різних експериментальних груп, може бути пов'язана з "активною" реакцією клітин кісткового мозку на різні метаболічні стани в організмі, які проявляються в зміні мікрооточення для клітин кісткового мозку. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що компоненти молозива мають регуляторний вплив не тільки на функціональну активність патологічно зміненої печінки, що було показано раніше, але й на функцію кісткового мозку.

В даний час важко відповісти на питання прямого чи опосередкованого впливу НКМ на клітини кісткового мозку. У зв'язку з цим виникає необхідність дослідження впливу компонентів молозива на інтактний організм.

### **3.3.5 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на характеристики клітин кісткового мозку інтактних тварин**

Знаходить широке застосування і особливо його окремі компоненти, зокрема, трансфер-фактор та ін. Його компоненти, які використовуються для запобігання і лікування цілого ряду патологій [222, 223]. Разом з тим, особливості впливу компонентів молозива в різних дозах на дорослий і старий організм, у якого вже сформувалася імунна система, залишається неясним і має велике значення на імунокомпетентні органи.

У цьому відношенні особливий інтерес представляє дослідження дозозалежного ефекту компонентів молозива на функції кісткового мозку у дорослого (статевозрілого) організму.

#### **3.3.5.1 Дослідження впливу різних доз низькомолекулярних компонентів молозива, які вводили тваринам *per os*, на кількість клітин кісткового мозку з 1 по 4 добу культивування в системі *in vitro***

Необхідно відзначити, що кількість клітин кісткового мозку, виділених з двох стегнових кісток у інтактних тварин і тварин, яким вводили компоненти молозива в різних дозах, було значуще подібним (Рис. 3.21 А). При цьому сумарна кількість ідентифікованих клітин у інтактних тварин становило близько 60 % від усіх типів клітин (Рис. 3.22 Б).

Введення експериментальним тваринам компонентів молозива в малих дозах 0,01 г і 0,1 г / 100 г маси тіла не впливало на загальну кількість морфологічно ідентифікованих клітин в кістковому мозку, в порівнянні з контролем (Рис. 3.21 Б). Однак, після введення компонентів молозива в великих дозах 1 г і 5 г / 100 г маси тіла, кількість ідентифікованих типів клітин становило лише 7-11%, а на частку неідентифікованих типів клітин припадало близько 90 % всіх типів клітин (Рис. 3.21 Б).

Отже, великі дози компонентів молозива, які вводили тваринам *per os*,

впливають на кількість морфологічно ідентифікованих типів клітин при збереження загальної кількості клітин на постійному рівні. Ці результати можна пояснити збільшенням швидкості транспорту клітин кісткового мозку до кротоку.

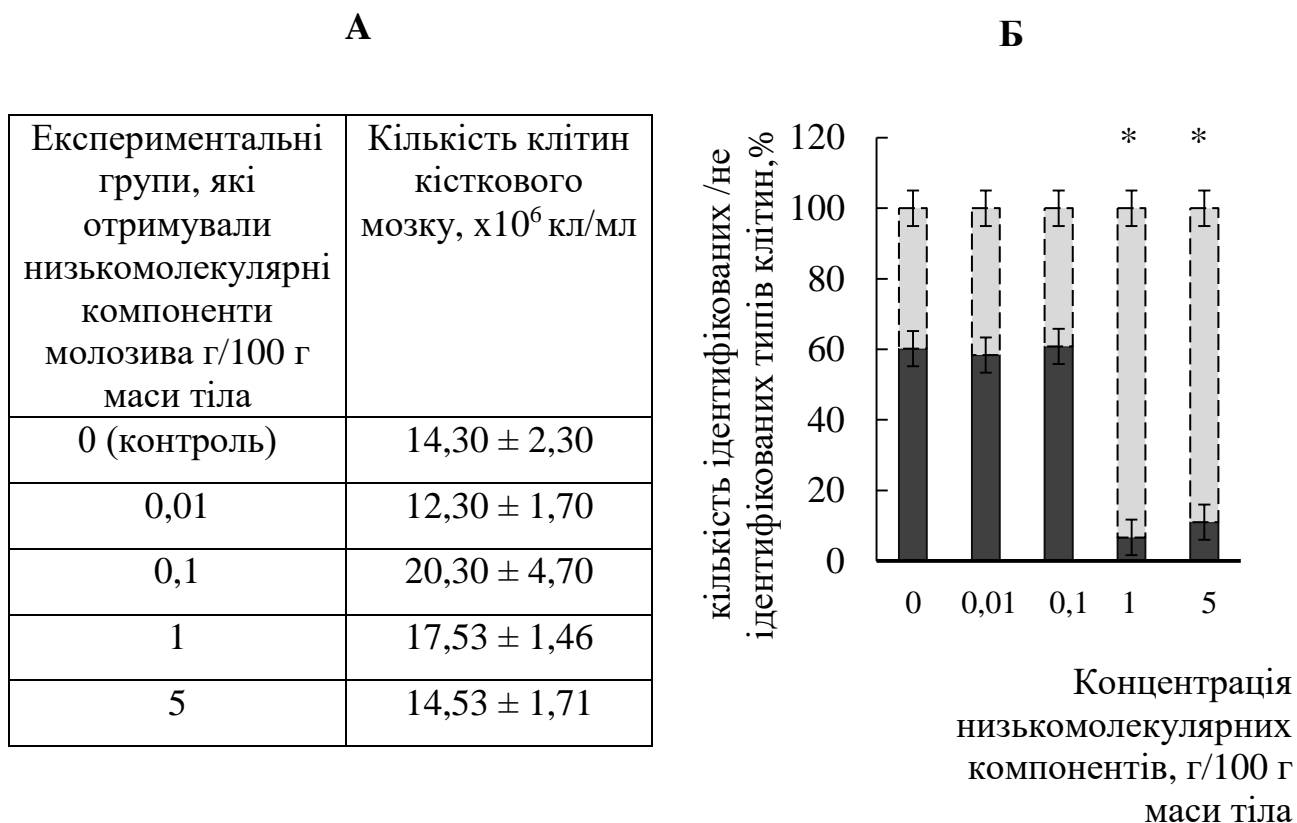


Рис. 3.21 Загальна кількість клітин кісткового мозку, виділених у інтактних тварин (контроль) і тварин, яким вводили різні дози компонентів молозива (А), а також сумарна кількість морфологічно ідентифікованих морфотипів (паличкоядерні нейтрофіли, сегментоядерні нейтрофіли, метамієлоцити, мієлоцити, лімфоцити, базофіли, нейтрофіли, моноцити) у відсотках від загальної кількості клітин ( ) і не ідентифікованих (в) (▨).

\* – при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

В данному випадку цікавим було дослідити склад морфологічних типів клітин кісткового мозку, які ідентифікуються, після різних доз НКМ.

Виявилося, що введення тваринам компонентів молозива в великих дозах 1 г і 5 г / 100 г маси тіла супроводжувалося суттєвими змінами патерна

морфологічно ідентифікованих типів клітин кісткового мозку. Так, серед морфологічно ідентифікованих типів клітин були виявлені тільки еозинофіли, інші типи клітин були представлені неідентифікованими типами клітин. Більш того, збільшення дози з 1 г / 100 г маси тіла до 5 г / 100 г маси тіла супроводжувалося збільшенням кількості еозинофілів з 6,7 % до 11 % від загальної кількості всіх клітин кісткового мозку (Рис. 3.22).

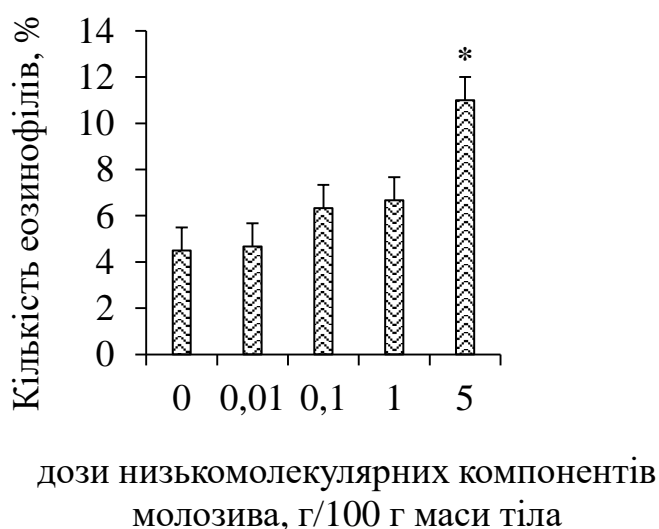


Рис. 3.22 Вміст еозинофілів в кістковому мозку контрольної групи (які не отримували компоненти молозива) і тварин, які отримували компоненти молозива в різних дозах

\* – при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

У інтактних тварин кількість еозинофілів становила 4,6 %, після введення компонентів молозива в дозі 0,01 г / 100 г маси тіла їх кількість залишалася незмінною в порівнянні з контрольним варіантом, при введенні дози 0,1 г / 100 г маси тіла – 6,4 %. Після введення дози 1 г / 100 г маси тіла їх кількість становила 6,7 %, а при введенні дози компонентів молозива 5 г / 100 г маси тіла – 11 % (Рис. 3.22). Отже, введення компонентів молозива в великих дозах приводило до еозинофілії в кістковому мозку і зміни патерну морфотипов клітин в кістковому мозку.

Як відомо, еозинофіли мають коротку «тривалість життя» в кров'яному

руслі і через 6-12 годин розподіляються в різні тканини [224]. Було цікаво визначити "час життя" («збереження») еозинофілів в культурі *in vitro*. Цей показник може свідчити про їхні якісні характеристики. З цією метою клітини кісткового мозку культивували в системі *in vitro*.

### 3.3.5.2 Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на «тривалість життя» еозинофілів в культурі *in vitro*

Якщо еозинофіли були виділені у інтактних тварин, то через 48 годин культивування *in vitro* їх кількість становила 73 % початкової кількості, а до 96 години - тільки 5 % від їх початкової кількості (Рис. 3.23).

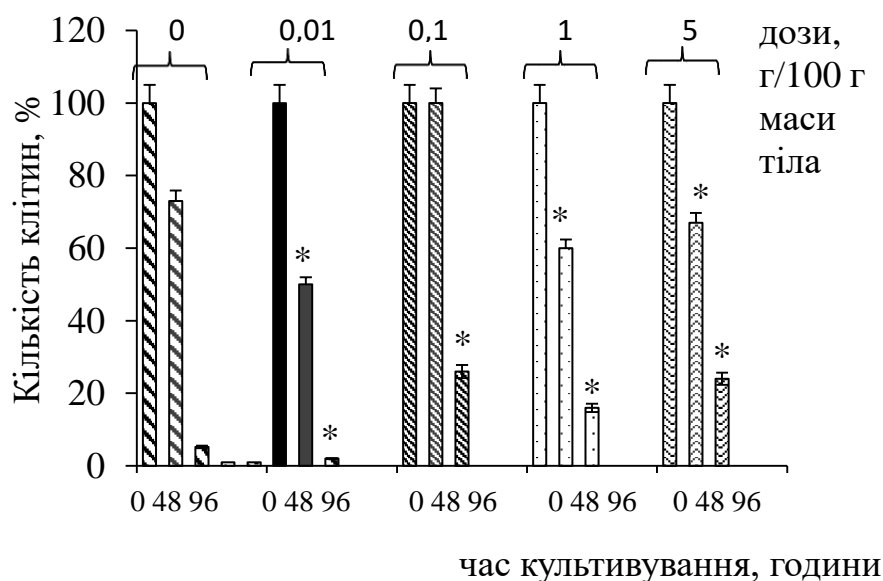


Рис. 3.23 Кількість еозинофілів у відсотках від початкової кількості в культурі *in vitro* через 48 і 96 годин їх культивування в стандартних умовах у разі їх отримання у контрольних тварин (0) і після введення компонентів молозива в дозі 0,01, 0,1, 1 і 5 г / 100 г маси тіла.

\* – при  $p \leq 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем

Якщо еозинофіли були отримані у тварин, яким вводили компоненти молозива в дозі 0,01 г / 100 г маси тіла, то їх загибель в культурі була лінійною в

часі. Через 48 годин в культурі залишалося 50%, а через 96 годин вони не виявлялися, тобто гинули інші 50% в системі *in vitro* (Рис. 3.23).

У той же час, якщо тваринам вводили дозу компонентів молозива, збільшену в 10 разів, то час їх збереження в культурі, навпаки, збільшувалася. Так, культивування протягом 48 годин не впливало на їх кількість, а в наступні 48 годин гинуло близько 70% культури, тобто до 96 години культивування зберігалось 26 - 30 % еозинофілів, що значно більше контрольного варіанту (Рис. 3.23). Збільшення дози компонентів молозива до 1 г і 5 г / 100 г маси тіла не впливало на кількість еозинофілів в культурі протягом 48 годин порівняно з інтактним контролем. Однак до 96 години в культурі залишалося 16 – 24 % від початкової кількості, що значущо більше контрольного варіанту (Рис. 3.23). Між собою ці варіанти доз не розрізнялися за «тривалістю життя» еозинофілів в культурі.

Отже, компоненти молозива по-різному функціонально впливали на типи клітин кісткового мозку, що піддавались морфологічній ідентифікації, що, відповідно, по-різному впливало на патерн морфологічно ідентифікованих клітин кісткового мозку. Компоненти молозива так функціонально впливають на еозинофіли, що також відображалось на зміні «тривалості життя» в системі *in vitro*. Ця залежність мала нелінійний дозо-залежний характер. Менша доза (0,01 г / 100 г маси тіла) скорочувала їх «тривалість життя» в культурі, великі дози збільшували її, в порівнянні з еозинофілами, отриманими у контрольній групі тварин. Таке збільшення «тривалості життя» еозинофілів, на фоні введення великих доз компонентів молозива, може мати важливе функціональне значення для усунення запального процесу в шлунково-кишковому тракті.

### **3.3.5.3 Дослідження впливу різних доз низькомолекулярних компонентів молозива на патерн клітин кісткового мозку**

Цікавим було дослідити здібність клітин кісткового мозку, зокрема еозинофілів, до проліферації в первинній культурі.



Виділені клітини кісткового мозку переводили в культуральне середовище DMEM так, щоб вихідна концентрація клітин у всіх досліджуваних варіантів становила 2 млн/мл. У тому випадку, якщо клітини були отримані у інтактних тварин (контроль), якщо вони активно проліферували і через 3 доби (вихід на стаціонарний рівень), їх кількість збільшилася в 2,8 рази від початкової (Рис. 3.24).

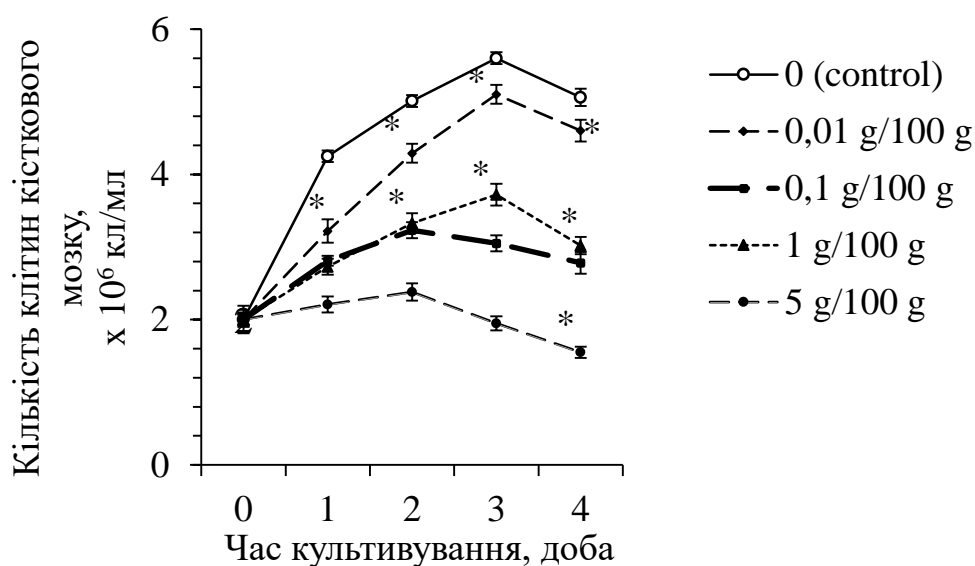


Рис. 3.24 кількість клітин кісткового мозку у первинній культурі з 1 по 4 добу культивування, отриманих у 3-міс. інтактних тварин (контроль) та тварин, яким вводили низькомолекулярні компоненти молозива троекратно з інтервалом 24 години між введеннями у різних дозах (від 0,01 до 5 г/ 100 г маси тіла)

Якщо тваринам за 24 години до виділення клітин кісткового мозку вводили компоненти молозива, то це пригнічувало розподіл клітин кісткового мозку в культурі і це залежало від дози компонентів молозива. Так, якщо тваринам за 24 години до виділення клітин кісткового мозку вводили 0,01 г / 100 г маси тіла, то вони також проліферували, проте відставали від контрольного варіанту на 25, 15, 10 і 10 %, відповідно, через 1,2,3 і 4 добу культивування (Рис. 3.24 Б). Збільшення дози компонентів молозива, що вводили тваринам *per os* до 0,1 г / 100 г маси тіла, супроводжувалося ще більшим інгібуванням проліферативної активності в системі *in vitro* (Рис. 3.25 Б) Разом з тим, збільшення дози компонентів молозива

в 10 разів, тобто, до 1 г / 100 г маси тіла не впливало на інтенсивність клітинного поділу клітин кісткового мозку, порівнюючи з дозою 0,1 г / 100 г маси тіла (Рис. 3.24 Б). Однак, якщо тваринам вводили дозу 5 г / 100 г маси тіла, то кількість клітин кісткового мозку, перенесених в систему *in vitro*, не збільшувалася, а на 4 добу культивування їх кількість зменшувалась на 23 % від початкового рівня (Рис. 3.24Б). У великих доз компоненти молозива проявляли цитотоксичний ефект щодо клітин кісткового мозку, та цей ефект проявлявся в системі *in vitro*.

Отже, введення експериментальним тваринам компонентів молозива *per os* супроводжувалось пригніченням проліферативної активності клітин кісткового мозку в системі *in vitro*. При введенні надвеликих доз (5 г / 100 г маси тіла), клітини кісткового мозку втрачали здатність до проліферації і гинули в культурі.

Такий ефект може бути пов'язаний з: 1. – Зі швидкою зміною типів клітинних популяцій в кістковому мозку на тлі компонентів молозива або / і 2. – зі зміною (епігенетичним перепрограмуванням) клітин кісткового мозку на тлі компонентів молозива, що впливало на їх подальшу поведінку в культурі. На користь такого припущення може вказувати зміщення рівноваги редокс-системи організму в бік прооксидантів на тлі великих доз компонентів молозива (Рис. 3.24 А).

Отже, компоненти молозива у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла , яку вводили тваринам з Cu-індукованим фіброзом печінки, приводили «до нормалізації», кількість лімфоцитів та нейтрофілів наближалась до контрольних значень, що можна пояснити збільшенням їх швидкості транспорту у кровоток. При цьому клітини, які утворювалися в кістковому мозку, у тварин з Cu-ідукованим фіброзом та отриманням НКМ здобували здатність до проліферації в культурі у порівнянні з клітинами, які були отримані у тварин з фіброзом печінки.

Разом з тим, введення НКМ інтактним тваринам супроводжувалося зменшенням зрілих клітин в кістковому мозку, збільшенням кількості морфологічно неіндефікованих (незрілих) клітин, а при більших дозах НКМ мало місце еозінофілія. НКМ знижували тривалість життя клітин кісткового мозку в превинній культурі.

Низькомолекулярні компоненти молозива суттєво впливали на зміну мікрооточення клітин кісткового мозку, яке впливало на функціональну активність кісткового мозку, спрямованність диференціювання клітин та їх характеристики. Компоненти молозива є перспективними субстанціями в регуляції функцій кісткового мозку.

### **3.4 Можливий взаємозв'язок йонного складу клітин кісткового мозку, отриманих у тварин різного віку, з їх проліферативною активністю**

При оцінці фізико-хімічного рівня регуляції клітин визначали вміст іонів кальцію (як вторинного месенджера регулятора метаболізму), іонів міді (як кофериенту великої кількості ферментів), вміст реактивних форм кисню в клітинах (як показника редокс-системи організму). При оцінці взаємозв'язку функціональної активності клітин кісткового мозку з фізико-хімічним рівнем регуляції визначали проліферативну активність клітин кісткового мозку в первинній культурі клітин, отриманих у молодих (3х міс) і старих (20-ти міс) інтактних щурів. З метою зміни мікрооточення для клітин кісткового мозку у молодих і старих тварин моделювали Cu-індукований фіброз печінки.

#### **3.4.1 Деякі характеристики йонного складу та редокс-системи клітин кісткового мозку молодих і старих тварин**

Отримані результати підтверджують висновок про те, що вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку залежать від особливостей мікрооточення. Компоненти мікрооточення безпосередньо впливають на формування епігенетичних патернів в клітинах, які, в свою чергу, регулюють метаболізм клітини (направленність і швидкість). Як відомо, регуляторна система є надзвичайно складною і забезпечується на різних рівнях. Базовим і, якщо можна сказати, інтегральним рівнем клітинної регуляції є фізико-хімічний рівень. До нього відносять, перш за все, йонний склад і редокс-систему. Можна

вважати, що система мікрооточення клітин кісткового мозку може впливати на фізико-хімічні характеристики клітин і, таким чином, впливати на інші характеристики клітин, в тому числі, активність проліферації і направленість диференціювання (характеристики морфотипів) і тривалість життя клітин.

Особливий інтерес в цьому відношенні відіграють йони кальцію, тому що вони є вторинним месенджером і беруть участь практично у всіх регуляторних механізмах клітини. Йони міді входять до складу більше 30 ферментів, впливають на їх активність, а надлишок і недолік міді в організмі ведуть до різноманітних патологій. Цікавим аспектом у формуванні редокс-системи клітини є вміст вільних форм кисню (ROS). У зв'язку з цим, визначення змісту йонів кальцію, йонів міді і ROS в клітинах кісткового мозку, отриманих у молодих і старих інтактних тварин і тварин із фіброзом печінки є обґрунтованим.

Клітини кісткового мозку, отримані у старих (20 міс.) щурів містили на 73 % більше кальцію в порівнянні з клітинами кісткового мозку, отриманими у молодих (3 міс.) щурів (Рис. 3.25). Виявилося, що морфологічні типи клітин кісткового мозку молодих і старих тварин представлені в однаковій кількості, за винятком лімфоцитів, яких було в 2,8 рази більше у старих тварин, в порівнянні з молодими тваринами (Рис. 3.25). Отримані результати дозволяють стверджувати, що клітини кісткового мозку молодих і старих тварин мають різний йонний склад.

Оскільки кістковий мозок представлений різними типами клітин, що знаходяться на різних стадіях диференціювання, то такі істотні відмінності за вмістом кальцію і міді можуть бути пов'язані з тим, що в кістковому мозку молодих і старих тварин містяться різні морфологічні типи клітин, які розрізняються за йонним складом. У зв'язку з цим, ми визначали 8 основних морфотипов (на них припадає 60 – 80 % всіх типів клітин кісткового мозку), – це лімфоцити, паличкоядерні і сегментоядерні нейтрофіли, метамієлоцити, мієлоцити, еозинофіли, базофіли і моноцити.

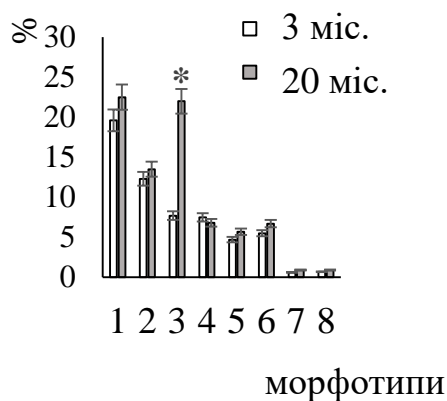


Рис. 3.25 Деякі морфологічні типи клітин кісткового мозку інтактних молодих та старих тварин (Б): 1 – паличкоядерні нейтрофіли; 2 – метамієлоцити; 3 – лімфоцити; 4 – сегментоядерні нейтрофіли; 5 – мієлоцити; 6 – еозинофіли; 7 – базофіли; 8 – моноцити.

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожен експериментальну групу, \*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

Як відомо, іонний склад клітини регулюється різними механізмами та впливає на функціональну активність клітин кісткового мозку. Іони металів входять до складу великої кількості ферментів і регулюють їх активність [197], забезпечують внутрішньоклітинний сигналінг [198], регулюють внутрішньоклітинний транспорт, впливають на характеристики редокс-системи клітини. Необхідно відзначити, що зміна змісту одного з елементів, зокрема, кальцію веде до зміни змісту та інших іонів в клітині.

Отримані результати вказують на відмінності клітин кісткового мозку молодих і старих тварин за сумарним вмістом заряджених частинок, зокрема, іонного складу і, як наслідок, фізико – хімічних характеристик. Важливою фізико-хімічною характеристикою клітин є редокс-система, на показники якої може впливати і іонний склад в клітці. Для оцінки показників редокс-системи визначали вміст вільних форм кисню в клітинах кісткового мозку.

Вміст вільних форм кисню в клітинах кісткового мозку старих тварин було в 2,5 рази менше, ніж в клітинах кісткового мозку молодих тварин (Рис. 3.26).

Ці результати дозволяють вважати, що рівновага в системі «прооксиданти – антиоксиданти» в клітинах кісткового мозку старих тварин зміщена в бік антиоксидантів, в той час, як в клітинах кісткового мозку молодих тварин воно зміщене в сторону прооксидантів.

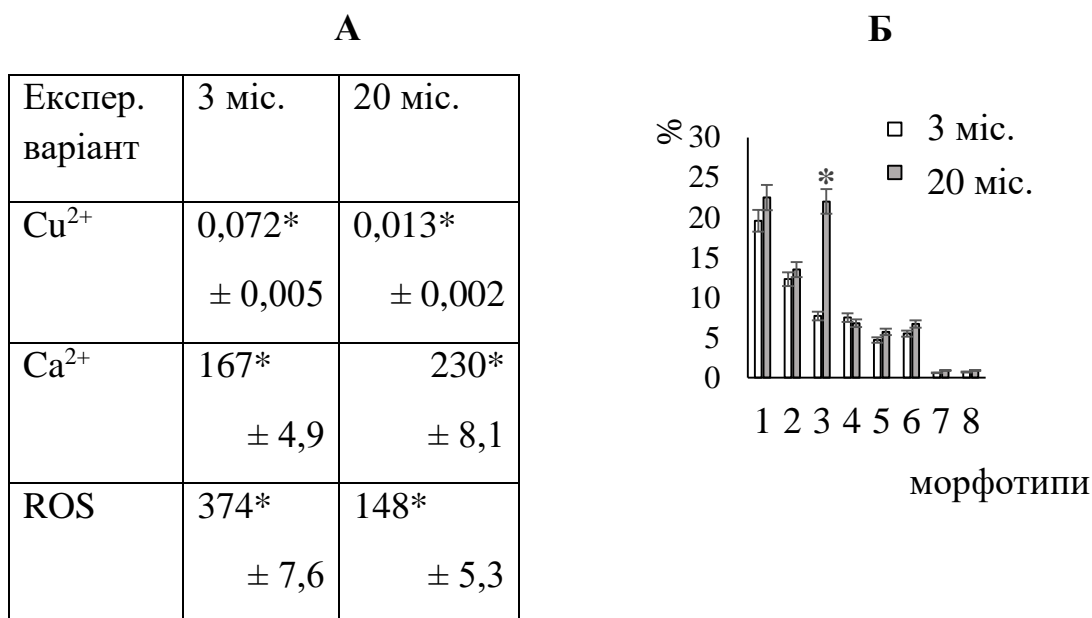


Рис. 3.26 Вміст йонів міді (мкг/10<sup>6</sup> кл), іонів кальцію (ум. од.), вільних форм кисню (ROS) (усл. од.) у клітинах кісткового мозку (А), що отримані у інтактних молодих та старих тварин.

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожную експериментальну групу, \*  $p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

Отже, одні й ті ж морфотипи клітин кісткового мозку, отримані у молодих і старих тварин, розрізнялися за іонним складом, вмісту вільних форм кисню, що може вказувати на їх функціональні відмінності.

Виявили, що вміст ROS в клітинах кісткового мозку старих тварин був у 2,5 рази менше, ніж в клітинах кісткового мозку молодих тварин (Рис. 3.26). Ці результати дозволяють вважати, що рівновага в системі «прооксиданти – антиоксиданти» в клітинах кісткового мозку старих тварин зміщена в бік

антиоксидантів, в той час, як в клітинах кісткового мозку молодих тварин вона зміщена в сторону прооксидантів.

Отже, одні й ті ж морфотіпи клітин кісткового мозку, отримані у молодих і старих тварин, розрізнялися за йонним складом, вмістом ROS, що може вказувати на їх функціональні відмінності, які були виявлені.

Виникає питання – як будуть змінюватися ці характеристики клітини кісткового мозку у молодих і старих тварин, якщо виникнуть патологічні зміни в інших органах організму, що вплине і на зміни в системі мікрооточення клітин кісткового мозку.

В якості такої патологічної моделі, яка супроводжується розвитком запального процесу, використовували модель Cu – індукованого фіброзу печінки [201].

### **3.4.2 Деякі характеристики йонного складу та редокс-системи клітин кісткового мозку молодих і старих тварин після інтоксикації сірчаною кислотою (індукція адаптивної відповіді)**

Раніше було показано, що триразові послідовні внутрішньоочеревинні введення експериментальним тваринам сірчаною кислотою міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла, що становило 33 % від летальної дози, супроводжувалося багатократним збільшенням вмісту екзогенних йонів міді в печінці і розвитком фіброзу печінки [62].

Виявилося, що наявність фіброзу печінки викликала вік-залежну адаптивну відповідь на рівні клітин кісткового мозку. Так, вміст йонів міді в клітинах кісткового мозку молодих тварин збільшувався тільки на 48 % від початкового рівня, в той час, як в їх вміст в клітинах кісткового мозку старих тварин збільшувався в 3,3 рази від початкового рівня (Рис. 3.27 А). Однак, навіть після таких змін, вміст йонів міді в клітинах кісткового мозку старих тварин залишався в 2,4 рази менше, в порівнянні з молодими тваринами (Рис. 3.26 А, 3.27 А).

Отже, зміна вмісту йонів міді в клітинах кісткового мозку на тлі вираженої інтоксикації організму сірчаною кислотою залежить не тільки від дози введеного токсиканта, а й від вмісту ендогенної міді в клітинах кісткового мозку, тобто вихідного стану. Початковий ж стан визначається віком тварин.

На тлі збільшення вмісту йонів міді в клітинах кісткового мозку спостерігалася, змінювався вміст кальцію, і це також залежало від віку. Так, вміст кальцію в клітинах кісткового мозку молодих тварин зменшувався на 75 % від їх початкового рівня; в цей час в клітинах кісткового мозку у старих тварин його вміст збільшувався від їх початкового рівня (Рис. 3.27 А).

Вміст ROS в клітинах кісткового мозку на тлі розвитку Cu – індукованого фіброзу печінки також мав виражену вік-залежну відповідь. Так, кількість ROS в клітинах кісткового мозку молодих тварин збільшувалася від їх початкового рівня на 58 %, а в клітинах кісткового мозку старих тварин, навпаки, зменшувалася на 28 % (Рис. 3.27 А).

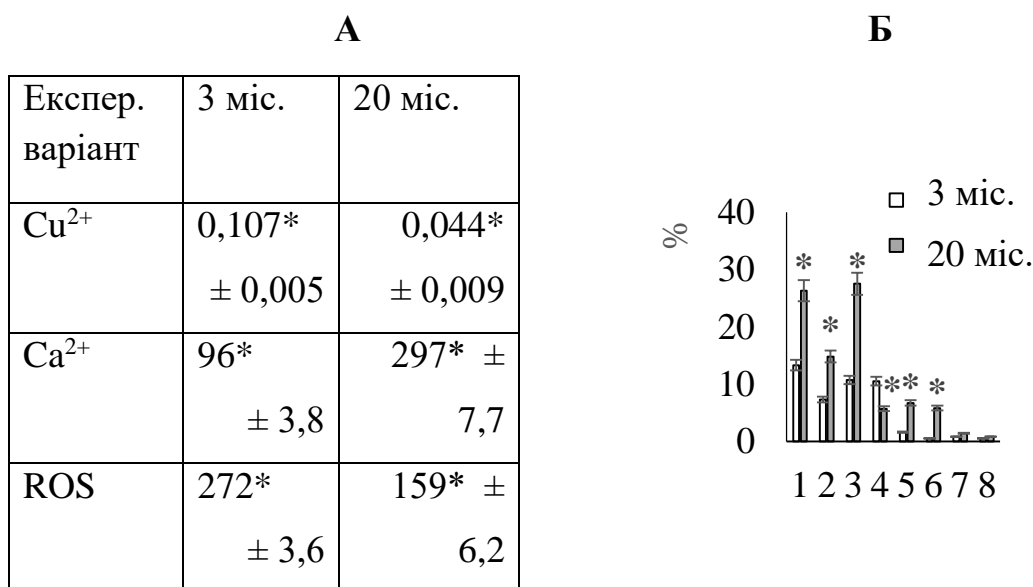


Рис. 3.27 Вміст йонів міді (мкг /  $10^6$  кл), йонів кальцію (ум. од.), ROS (ум. од.) В клітинах кісткового мозку (А) і кількість морфологічно ідентифікованих морфотипов (Б) (1 – паличкоядерні нейтрофіли; 2 – метамієлоцити; 3 – лімфоцити; 4 – сегментоядерні нейтрофіли; 5 – мієлоцити; 6 – еозинофіли; 7 – базофіли; 8 – моноцити.), отриманих у молодих тварин і старих тварин після



інтоксикації сірчаною кислотою.

Дані виражені у відсотках  $\pm$  похибка середнього,  $n = 6$  на кожен експериментальну групу,  $* p \leq 0.05$  порівняно з клітинами кісткового мозку, отриманими у старих тварин, за тестом Манна – Уїтні

Виражені вік-залежні зміни в йонному складі і в показниках редокс-системи клітини супроводжувалися зміною співвідношень морфологічних типів диференційованих типів клітин кісткового мозку.

Так, в кістковому мозку старих тварин було збільшено вміст паличкоядерних нейтрофілів на 98 %, метамієлоцитів на 103 %, лімфоцитів в 1,5 раза, мієлоцитів в 3 раза та зменшений вміст сегментоядерних нейтрофілів на 1,6 раза в порівнянні з молодими тваринами на тлі інтоксикації організму (Рис. 3.26 Б).

Отже, вік-залежні зміни йонного складу і показників редокс-системи клітин кісткового мозку на тлі інтоксикації організму сірчаною кислотою супроводжуються і різним відповіддю на клітинному рівні, що виявляється зміною направленості диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин і швидкості проліферації клітин кісткового мозку.

Для оцінки можливого взаємозв'язку фізико-хімічних характеристик з проліферативною активністю, клітини кісткового мозку виділяли у молодих і старих тварин, переводили їх в культуру і визначали кількість клітин з першої по четверту добу росту, як було описано вище.

Між характеристиками фізико-хімічних показників клітин та проліферативною відповіддю на інтоксикацію організму, яка супроводжувалася розвитком фіброзу печінки, є ієрархічний взаємозв'язок, та на його характер впливає вік, точніше передісторія або початковий стан на момент впливу. Якщо це припущення має місце, то можна очікувати, що НКМ молодих та старих тварин в рамках одного морфотипу, які розрізняються за морфологічними характеристиками, будуть відрізнятися за своїми функціональними характеристиками.

Отримані результати вперше показали, що клітини кісткового мозку старих тварин відрізнялися від клітин молодих тварин за фізико-хімічними характеристиками, зокрема, за вмістом таких важливих регуляторних іонів як кальцій і мідь, також за вмістом реактивних форм кисню. На різних експериментальних моделях (фіброз, індукований різними гепатотоксичними сполуками, біологічно активні сполуки молочива) показано, що характер змін фізико-хімічних характеристик визначається змінами мікрооточення клітин кісткового мозку. Важливим фактором, який впливає на фізико-хімічні характеристики клітин кісткового мозку, є початковий стан клітин, який, в свою чергу, визначається віком тварин. Між фізико-хімічними характеристиками клітин та їх функціональними характеристиками, зокрема проліферативною активністю, є взаємозв'язок.

Якщо виходити з того, що життєдіяльність - це темпоральний процес безперервної адаптації, який спрямований на дотримання принципу оптимальності, а він забезпечується завдяки досвіду про минулі події (метаболічної пам'яті), наслідком чого є звуження вибору нових адаптивних стратегій, що і проявляється в порушенні принципу оптимальності і збільшенні вік-залежних патологій, тобто старіння (Рис. 3.28).



Рис. 3.28 Схema, яка демонструє, що в процесі життєдіяльності, тобто безперервної адаптації (показано стрілками F1 - F<sub>n</sub>) можна виділити етапи розвитку або становлення метаболічної системи з виходом на оптимальний рівень функціонування ( $\leftrightarrow$ ). Оптимальний рівень підтримується завдяки формуванню метаболічної пам'яті, тобто використанням одних і тих же метаболічних шляхів з безлічі альтернативних. В онтогенезі існує період досягнення оптимальності у формуванні швидкої та адекватної відповіді метаболізму на дію екзогенних факторів (показано  $\leftrightarrow$ ). При дії нових факторів середовища або їх комбінацій (F<sub>4</sub>, F<sub>n</sub>) метаболічна пам'ять обмежує стратегії вибору нових адаптивних рішень і це може проявлятися у вигляді хронічних або гострих вік-залежних патологій.

Ключовим поняттям в цьому трактуванні процесу старіння є принцип оптимальності. Під оптимальністю метаболічних процесів ми розуміємо такі адаптивні рішення, які забезпечують «адекватну» відповідь згідно «вимог» оточення (середовища) в найкоротші терміни з мінімальними енергетичними

затратами, тобто оптимальний баланс між усіма регуляторними та виконавчими системами організму в конкретних умовах існування.

Суть проблеми зводиться до необхідності зрозуміти, як формується метаболічна пам'ять і чому вона, на певному етапі онтогенезу, веде до обмеження принципу адекватної оптимальності.

Складність у вирішенні цієї проблеми в тому, що ми стикаємося з мінливою темпоральною системою відповіді організму на одночасну дію величезної кількості чинників, а сама відповідь формується великою кількістю ефекторних систем організму.

Якщо практично всі тканини організму мають регуляторний вплив на інші системи шляхом постійного виділення метаболітів, то кістковий мозок, разом з цим, забезпечує регуляторні функції на рівні організму та шляхом синтезу, а також транспорту до кровотоку імунокомпетентних клітин і клітин крові. Більш того, спрямованість диференціювання клітин кісткового мозку, їх функціональна активність залежить від потреб організму в даний момент часу, яке регулюється його мікрооточенням.

Як відомо, у старих тварин змінено зміст широкого спектра біологічно активних сполук в крові. Зокрема, продуктів вільно-радикальних реакцій, вмісту інтерлейкінів, факторів росту і стрес-білків. Ці показники гомеостазу надавали інтегральний вплив на мікрооточення клітин кісткового мозку. Це, в свою чергу, веде до невеликої зміни пулу клітин, що містяться в кістковому мозку.

Результати досліджень дозволяють прийти до двох основних висновків: 1 - іонний склад і склад низькомолекулярних метаболітів істотно змінюється з віком тварин. Це може відображати вік-залежну зміну мікрооточення клітин кісткового мозку, яке відображає інтегративні зміни в організмі. 2 - між іонами в клітинах кісткового мозку існує взаємозв'язок, однак він не є жорстким.

Про це свідчить різноспрямованість змін між цими показниками у інтактних молодих і старих тварин. Отже, в клітинах кісткового мозку молодих і старих тварин формуються різні характеристики, а точніше - патерн компонентів фізико-хімічного рівня організації.

Для перевірки цього, було експериментально змінено мікрооточення клітин кісткового мозку шляхом індукції фіброзу печінки.

Виявилося, що в клітинах кісткового мозку молодих і старих тварин встановилося нове співвідношення між досліджуваними показниками. Це підтверджує високу лабільність цих показників в процесі адаптації. Відповідь на рівні фізико-хімічних показників у клітинах кісткового мозку молодих і старих тварин була різною, тобто їх відповідна реакція залежить від вихідних станів відповідних показників або наявного минулого «досвіду».

Ці результати підтверджують високу лабільність фізико-хімічного рівня регуляції у відповідь на адаптивне вплив і відповідь на зміну мікрооточення клітин залежить від характеристик вихідних станів цих показників, а також на початковий стан досліджуваних показників може впливати минулий досвід (метаболічна і клітинна пам'ять).

Якщо підвести короткий підсумок викладеному, то можна вважати, що компоненти метаболітів, що змінюються, які, в свою чергу, екскретуються до кровотоку в результаті безперервної адаптації організму, змінюють мікрооточення клітин кісткового мозку. Цей процес супроводжується зміною фізико-хімічних характеристик гомеостазу клітини, що, в свою чергу, супроводжується зміною їх функціональних характеристик навіть у межах одного і того ж морфологічного типу клітин. Ці характеристики клітин, які формуються, якщо вони підтримуються досить довго в часі, здатні «запам'ятовуватися» на метаболічному та клітинному рівнях, тобто мають властивість самопідтримки.

Отримані результати дозволяють вважати, що наявність тих чи інших патологій в організмі, які супроводжуються змінами характеристик мікрооточення клітин кісткового мозку, впливають на направленість дифірінцювання клітин кісткового мозку та швидкість їх транспорту у кровоток та можливість корекцію (відновлення) змінених функцій патологічних станів компонентами мозку.

### Висновки до розділу 3

Як відомо, кістковий мозок -унікальна тканина, яка найбільш динамічно змінюється, вона багата стовбуровими клітинами і постійно формує нові популяції клітин крові. Кількість клітин, які виникають в кістковому мозку, і їх типи виконують регуляторну функцію в організмі, впливають на активність імунної системи та інших тканин організму. Виходячи з цього, кістковий мозок може розглядатися як один з основних регуляторів функціональних характеристик організму

Цю складну інтегративну функцію кістковий мозок здатен здійснювати завдяки тому, що в ньому синтезується така кількість і такі типи клітин, які необхідно в даний час організму з урахуванням змінених функціональних станів тих чи інших органів для збереження гомеостазу. Або іншими словами, контроль за функціональним станом систем організму кістковий мозок здійснює шляхом «прийому» характеристик мікрооточення, а відповідає на ці зміни швидкістю та спрямованістю диффінціювання мезенхімальних стовбурових клітин у такі типи клітин, які можуть забезпечити регуляцію гомеостатичного рівня. Не дивлячи на очевидність подібних міркувань, експериментальних перевірок цієї гіпотези доки немає. Особливий інтерес представляють дослідження характеристик клітин клітинного мозку в процесі старіння, під час розвитку тих чи інших патологій. Виходячи з цього, метою даної роботи було дослідити вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на певні характеристики клітин кісткового мозку.

Необхідно відмітити, що певні фізико-хімічні характеристики та біохімічні характеристики клітин можуть змінюватися зберігаючи свої морфологічні особливості. Отже, функціональні властивості клітин можуть бути набагато різноманітніше ніж морфотипи клітин.

У зв'язку з цим в клітинах кісткового мозку визначали кількість кальцію, міді, реактивних форм кисню. В роботі було показано, що зміни мікрооточення клітин кісткового мозку у старих тварин супроводжувалися зміною в них вмісту

іонів кальцію, міді і реактивних форм кисню при збереженні основних морфотипів клітин як у молодих тварин. Як відомо, іони кальцію виконують в клітині велику кількість функцій в тому числі і функцію вторинних месенджерів.

Відомо, що між вмістом кальцію в клітині та проліферативною активністю цих клітин є взаємозв'язок. В нашій роботі було показано, що клітини кісткового мозку старих тварин, які мали більшу кількість кальцію ніж молоді, проявляли більшу проліферативну активність в культурі ніж клітини молодих тварин. Ці результати дозволяють зробити два важливих висновка: 1 – одні і теж самі морфологічні типи клітин можуть виконувати різні функції і це залежить від інтегральних характеристик мікрооточення клітин кісткового мозку; 2 – характеристики мікрооточення у старих тварин змінюється, що супроводжується формуванням клітин кісткового мозку з іншими ніж у клітин молодих тварин властивостями. У користь цього свідчать отримані в роботі дані щодо різною відповідної реакції клітин кісткового мозку, які отримані у молодих і старих тварин, на введення 4 і 8 мМ  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ .

Виявилося, що якщо екзогенні іони міді інгібували проліферативну активність клітин і для неї була характерна пряма дозова залежність, то у випадку клітин, які були отримані у старих тварин, по-перше, ефект інгібування був значно меншим і, по-друге, мала місце зворотня дозова залежність.

Щодо впливу мікрооточення на характеристики клітин кісткового мозку свідчать дані, які отримані в нашій роботі на моделі Cu-індукованого та  $\text{CCl}_4$ -індукованого фіброзу.

Було показано, що введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді супроводжувалося накопиченням її у печінці, в кістковому мозку її кількість змінювалася несуттєво. При цьому у таких тварин змінювався цитокіновий профіль в сировотці крові, майже у 2 рази збільшувалась кількість продуктів вільнорадикальних реакцій, які також виконують важливу роль в формуванні редокс системи організму.

Було показано, що на тлі фіброзу печінки та зміни мікрооточення змінювався паттерн морфотипів клітин в кістковому мозку, змінювалися фізико-

хімічні характеристики клітин кісткового мозку (вміст кальцію, міді, ROS), змінювалася здібність клітин до проліферації та їх тривалість життя в культурі.

Важливо відмітити, що фіброз, який був індукованим різними факторами, мав різний вплив на характеристики клітин кісткового мозку. Отже, кістковий мозок має «здібність ідентифікувати» тонкі зміни у складі мікрооточення

Ще однією важливою особливістю відповіді клітин кісткового мозку на зміни мікрооточення є те, що на відповідь клітин впливає вік тварин, а точніше початковий стан характеристик клітин кісткового мозку, який сформувалися у тварин. Ці результати свідчать про складний характер взаємовпливу різних факторів.

Важливим результатом цієї роботи є можливість використання низькомолекулярних компонентів молозива для усунення фіброзу печінки на клітини кісткового мозку.

Отримані результати підтверджують роль мікрооточення в функціонуванні кісткового мозку, з однієї сторони, та вказують на можливе практичне використання цього підходу.

Результати досліджень цього розділу наведено в публікаціях [2, 59-62, 120-125].



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено важливе наукове завдання – встановлено вплив мікрооточення, зміненого індукованим фіброзом печінки та віком тварин, на характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі. Виявлено, що характеристики клітин кісткового мозку (вміст іонів кальцію, іонів міді, вільних форм кисню; здатність до проліферації та «тривалість життя» у первинній культурі, співвідношення морфологічно ідентифікованих/неідентифікованих типів клітин) залежить не від віку як такого, а від характеристик мікрооточення клітин кісткового мозку, яка моделюється функціональним станом печінки та біологічно активними сполуками, такими як, низькомолекулярні компоненти молозива.

1. Проліферативна активність клітин кісткового мозку, виділених у старих (20 міс.) інтактних тварин і переведених до культури *in vitro*, перевершувала проліферативну активність клітин кісткового мозку молодих (3 міс.) тварин у первинній культурі.

2. Зміна мікрооточення шляхом індукції фіброзу печінки введенням сірчаноокислої міді та чотирьоххлористого вуглецю викликало вік-залежну зміну кількості клітин кісткового мозку у первинній культурі.

Так, Cu – індукований фіброз печінки супроводжується пригніченням швидкості росту клітин у первинній культурі, отриманих у молодих тварин, у той час, як клітини кісткового мозку, отримані у старих тварин та переведені у первинну культуру, зберігали проліферативну активність, на відміну від молодих тварин, хоча відставали від контролю.

CCL<sub>4</sub> – індукований фіброз печінки викликав іншу вік-залежну відповідь на рівні клітин кісткового мозку. Якщо клітини кісткового мозку були виділені у молодих тварин з CCL<sub>4</sub> – індукований фіброз печінки, то вони не відрізнялися за проліферативною активністю від контролю. У той же час, якщо клітини кісткового мозку були виділені у старих тварин з CCL<sub>4</sub> – індукований фіброз печінки, то їх проліферативна активність не відрізнялася від контролю.

3. У кістковому мозку інтактних старих (20 міс.) тварин містилась більша кількість лімфоцитів (в 2,8 рази) у порівнянні з кістковим мозком молодих (3 міс.) тварин, співвідношення інших морфологічно ідентифікованих типів клітин кісткового мозку у старих тварин не відрізнялась від молодих тварин.

4. Клітини кісткового мозку, що були отримані у молодих та старих тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки, по-різному реагували на внесення сірчаноокислої міді до первинної культури.

Внесення 4 мМ та 8 мМ сірчаноокислої міді до культури клітин кісткового мозку молодих тварин супроводжувалась дозо-залежним характером інгібування проліферативної активності. У культурі клітин кісткового мозку старих тварин мала місце зворотна дозова залежність, як для інтактних, так і для тварин з фіброзом печінки.

5. Зміна характеристик мікрооточення, що була викликана триразовим щоденним введенням низькомолекулярних компонентів молозива тваринам з Cu-індукованим фіброзом печінки супроводжувалась збільшенням проліферативної активності клітин кісткового мозку у первинній культурі. Загальна кількість морфологічно диференціюються клітин в кістковому мозку зменшувалась в порівнянні з інтактними тваринами і тваринами з фіброзом.

6. Зміна характеристик мікрооточення для клітин кісткового мозку, отриманих у молодих і старих інтактних тварин, супроводжувалась зміною таких фізико-хімічних характеристик, як вміст іонів міді, іонів кальцію та вільних форм кисню, що супроводжувалось та зміною проліферативної активності у цих клітинах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Москва: Глобус, 2008. 150 с.
2. Bozhkov A. I., Ohienko S. L., Bondar A. Yu., Klimova E. M., Ivanov E. G. Liver-induced fibrosis in young and old animals is accompanied by age-dependent changes in bone marrow cells // *Advances in Gerontology*. 2019. Vol. 32(1-2). P. 45-54.
3. Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry // *Journal of Gerontology*. 1956. Vol. 11(3). P. 298–300.
4. Bersani F. S., Lindqvist D., Mellon S. H., Epel E. S., Yehuda R. Association of dimensional psychological health measures with telomere length in male war veterans // *J Affect Disord*. 2016. Vol. 190. P. 537-542.
5. O'Brien E. J., Monk J. M., Palsson B. O. Using Genome-scale models to predict biological Capabilities // *Cell*. 2015. Vol. 161(5). P. 971-987.
6. Zhou B. O., Ding L., Morrison S. J. Hematopoietic stem and progenitor cells regulate the regeneration of their niche by secreting Angiopoietin-1 // *Elife*. 2015. Vol. 4. P. e05521.
7. Florencio-Silva R., Sasso G. R., Sasso-Cerri E., Simões M. J., Cerri P. S. Biology of bone tissue: structure,function, and factors that influence bone cells // *Biomed Res Int*. 2015. Vol. 2015. P. 421746-421763.
8. Bara J. J., Richards R. G., Alini M., Stoddart M. J. Concise review: bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic // *Stem Cells*. 2014. Vol. 32(7). P. 1713-1723.
9. Gallagher K. A., Joshi A., Carson W. F., Schaller M., Allen R., Mukerjee S., Kittan N., Feldman E. L., Henke P. K., Hogaboam C., Burant C. F., Kunkel S L.. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflamMatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes // *Diabetes*. 2015. Vol. 64(4). P. 1420-1430.

10. Douglas J. Weiss. Schalm's Veterinary Hematology. 6th Edition. Wiley-Blackwell: American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2010. 1232 p.
11. Jacobs R. M., Messick J. B., Valli V. E. Tumors of the hemolymphatic system. Tumors in domestic animals: John Wiley & Sons, Inc., 2002. 119-198 p.
12. Becher B., Tugues S., Greter M. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation // *ImMunity*. 2016. Vol. 45(5). P. 963-973.
13. Kast R. E., Hill Q. A., Wion D., Mellstedt H., Focosi D., Karpel-Massler G., Halatsch M. E. Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin // *Tumor Biology*. 2017. Vol. 39(5). P. 1-10.
14. Wicks I. P., Roberts A. W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases // *Nature Reviews Rheumatology*. 2016. Vol.12(1). P. 37-48.
15. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W. G., Harris S. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size // *Nature*. 2003. Vol. 425(6960). P. 836-841.
16. Nagasaki T., Hara M., Nakanishi H., Takahashi H., Sato M., Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction // *British journal of cancer*. 2014. Vol. 110(2). P. 469-468.
17. Schenten D., Nish S. A., Yu S., Yan X., Lee H. K., Brodsky I., Zhao H. Signaling through the adaptor molecule MyD88 in CD4<sup>+</sup> T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells // *ImMunity*. 2014. Vol. 40(1). P. 78-90.
18. Zhao E., Xu H., Wang L., Kryczek I., Wu K., Hu Y., Wang G., Zou W. Bone marrow and the control of imMunity // *Cell Mol ImMunol*. 2012. Vol. 9(1). P. 11-19.
19. Orkin Stuart H., Leonard I. Zon. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology // *Cell*. 2008. Vol. 132(4). P. 631-644.
20. Chambers S. M., Shaw C. A., Gatza C., Fisk C. J., Donehower L. A.,

- Goodell M. A. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation // *PLoS biology*. 2007. Vol. 5(8). P. e201.
21. Choi M., Scholl U. I., Ji W., Liu T., Tikhonova I. R., Zumbo P., Nelson-Williams C. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106(45). P. 19096-19101.
  22. Orsini F., Migliaccio E., Moroni M., Contursi C., Raker V. A., Piccini D., Puri, C. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279(24). P. 25689-25695.
  23. Beausejour C. M., Campisi J. Ageing: balancing regeneration and cancer // *Nature*. 2006. Vol. 443(7110). P. 404-412.
  24. Caplan A. I., Dennis J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators // *Journal of cellular biochemistry*. 2006. Vol. 98(5). P. 1076-1084.
  25. da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // *Journal of cell science*. 2006. Vol. 119(11). P. 2204-2213.
  26. Stadnikov A. A., Shevliuk N. N. Stem cells and reparative regeneration in mammalian postnatal ontogenesis // *Morfologiya*. 2006. Vol. 130(36). P. 84–88.
  27. Prezioso C., Orlando V. Polycomb proteins in mammalian cell differentiation and plasticity // *FEBS letters*. 2011. Vol. 585(13). P. 2067-2077.
  28. Haynes B. F., Markert M. L., Sempowski G. D., Patel D. D., Hale L. P. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection // *Annual review of immunology*. 2008. Vol. 18(1). P. 529-560.
  29. Simonsen J. L., Rosada C., Serakinci N., Justesen J., Stenderup K., Rattan S. I., Kassem M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells // *Nature biotechnology*. 2002. Vol. 20(6). P. 592-602.
  30. Leskelä H. V., Risteli J., Niskanen S., Koivunen J., Ivaska K. K.,

- Lehenkari P. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood // *Biochemical and biophysical research communications*. 2003. Vol. 311(4). P. 1008-1013.
31. Justesen J., Stenderup K., Ebbesen E. N., Mosekilde L., Steiniche T., Kassem, M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis // *Biogerontology*. 2001. Vol. 2(3). P. 165-171.
  32. Scharstuhl A., Schewe B., Benz K., Gaissmaier C., Bühring H. J., Stoop R. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology // *Stem cells*. 2007. Vol. 25(12). P. 3244-3251.
  33. Bergman R. J., Gazit D., Kahn A. J., Gruber H., McDougall S., Hahn, T. J. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice // *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996. Vol. 11(5). P. 568-577.
  34. Bellows C. G., Pei W., Jia Y., Heersche J. N. M. Proliferation, differentiation and self-renewal of osteoprogenitors in vertebral cell populations from aged and young female rats // *Mechanisms of ageing and development*. 2003. Vol. 124(6). P. 747-757.
  35. Tokalov S. V., Grüner S., Schindler S., Wolf G., Baumann M., Abolmaali N. Age-related changes in the frequency of mesenchymal stem cells in the bone marrow of rats // *Stem cells and development*. 2007. Vol. 16(3). P. 439-446.
  36. Mareschi K., Ferrero I., Rustichelli D., Aschero S., GamMaitoni L., Aglietta M., Fagioli F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow // *Journal of cellular biochemistry*. 2006. Vol. 97(4). P. 744-754.
  37. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells // *Bone*. 2003. Vol. 33(6). P. 919-926.
  38. Shi Y. Y., Nacamuli R. P., Salim A., Longaker, M. T. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging // *Plastic and reconstructive surgery*. 2005. Vol. 116(6). P. 1686-1696.
  39. Wall M. E., Bernacki S. H., Loba, E. G. Effects of serial passaging on the

- adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells // *Tissue engineering*. 2007. Vol. 13(6). P. 1291-1298.
40. D'ippolito G., Schiller P. C., Ricordi C., Roos B. A., Howard G. A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow // *Journal of bone and mineral research*. 1999. Vol. 14(7). P. 1115-1122.
  41. Mendes S. C., Tibbe J. M., Veenhof M., Bakker K., Both S., Platenburg P. P., Van Blitterswijk C. A. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age // *Tissue engineering*. 2002. Vol. 8(6). P. 911-920.
  42. Zheng H., Fu G., Dai T., Huang, H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway // *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007. Vol. 50(3). P. 274-280.
  43. Feng Z., Zhang H., Levine A. J., Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. Vol. 102(23). P. 8204-8209.
  44. Harrison D. E., Archer J. R. Physiological assays for biological age in mice: relationship of collagen, renal function, and longevity // *Experimental aging research*. 1983. Vol. 9(4). P. 245-251.
  45. Martin R. M., Brady J. L., Lew A. M. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice // *Journal of immunological methods*. 1998. Vol. 212(2). P. 187-192.
  46. Sudo K., Ema H., Morita Y., Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells // *Journal of Experimental Medicine*. 2000. Vol. 192(9). P. 1273-1280.
  47. Morrison S. J., Wandycz A. M., Akashi K., Globerson A., Weissman I. L. The aging of hematopoietic stem cells // *Nature medicine*. 1996. Vol. 2(9). P. 1011-1016.
  48. Katayama Y., Battista M., Kao W. M., Hidalgo A., Peired A. J., Thomas, S. A.,

- Frenette P. S. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow // *Cell*. 2006. Vol. 124(2). P. 407-421.
49. Kanazawa H., Fujimoto Y., Teratani T., Iwasaki J., Kasahara N., Negishi K., Kobayashi E. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model // *PloS one*. 2011. Vol. 6(4). P. e19195.
  50. Katsara O., Mahaira L. G., Iliopoulou E. G., Moustaki A., Antsaklis A., Loutradis D., Perez S. A. Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem cells and development*. 2011. Vol. 20(9). P. 1549-1561.
  51. Baker N., Boyette L. B., Tuan R. S. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging // *Bone*. 2015. Vol. 70. P. 37-47.
  52. Van Zant G., Liang, Y. The role of stem cells in aging // *Experimental hematology*. 2003. Vol. 31(8). P. 659-672.
  53. Rossi D. J., Bryder D., Zahn J. M., Ahlenius H., Sonu R., Wagers A. J., Weissman, I. L. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. Vol. 102(26). P. 9194-9199.
  54. Dykstra B., Olthof S., Schreuder J., Ritsema M., de Haan G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells // *Journal of Experimental Medicine*. 2011. Vol. 208(13). P. 2691-2703.
  55. Beerman I., Bhattacharya D., Zandi S., Sigvardsson M., Weissman I. L., Bryder D., Rossi D. J. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. Vol. 107(12). P. 5465-5470.
  56. Cho R. H., Sieburg H. B., Muller-Sieburg C. E. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells // *Blood*. 2008. Vol. 111(12).



P. 5553-5561.

57. Liang Y., Van Zant G., Szilvassy S. J. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells // *Blood*. 2005. Vol. 106(4). P. 1479-1487.
58. Russo F. P., Kallis Y. N., Alison M. R., Forbes S. J. Bone marrow cells in the liver: Diverse cells, diverse effects // *Hepatology*. 2007. Vol. 46 (2). P. 604-605.
59. Ohienko S.L, Bondar A. Yu, Ivanov E.G, Bozhkov A.I. Liver fibrosis has a different effect on the “lifespan” of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats // *MOJ Gerontol Ger*. 2019. Vol. 4(1). P. 36-40.
60. Ohienko S. L., Bozhkov A. I., Bondar A. Yu., Ivanov E. G., Ionov I. A. Bone marrow cells obtained from old animals differ from the young animals cells in their ability to divide and in response to the presence of liver fibrosis in primary culture // *Advances in Aging Research*. 2019. Vol. 8. P. 14-27.
61. Bozhkov A. I., Ohienko S. L., Kuznetsova Y. A., Bondar A. Y., Marchenko V. P., Gumennaya M. S. Donor age affects behavior and sensibility of bone marrow cells to copper ions in primary culture // *Advances in Gerontology*. 2017. Vol. 7(4). P. 336-344.
62. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Kuznetsova Y. A., Ohienko S. L., Bondar A. Y. Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture // *Frontiers in Biology*. 2017. Vol. 12(4). P.271-279.
63. Sakaida I. Cell therapy with bone marrow cell for liver cirrhosis // *Electrophoresis*. 2006. Vol. 50. P. 7–12.
64. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Aoyama K., Ishikawa T., Nishina H., Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice // *Hepatology*. 2004. Vol. 40. P.1304–1311.
65. Terai S., Sakaida I., Yamamoto N., Omori K., Watanabe T., Ohata S., Okita K. An in vivo model for monitoring transdifferentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes // *J. Biochem*. 2003. Vol. 134. P. 551–558.
66. Terai S., Ishikawa T., Omori K., Aoyama K., Marumoto Y., Urata Y., Okita K.

- Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy // *Stem Cells*. 2006. Vol. 24(10). P. 2292–2298.
67. Kuo T. K., Hung S. P., Chuang C. H., Chen C. T., Shih Y. R. V., Fang S. C. Y., Lee O. K. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success for using bone marrow mesenchymal stem cells // *Gastroenterology*. 2008. Vol. 134. P. 2111–2121.
  68. Yu Y., Yao A. H., Chen N., Pu L. Y., Fan Y., Lv L., Wang X. H. Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration // *Mol. Ther.* 2007. Vol. 15. P. 1382–1389.
  69. Yagi K., Kojima M., Oyagi S., Ikeda E., Hirose M., Isoda K., Ohgushi H. Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine // *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2008. Vol. 128. P. 3–9.
  70. Hong S. H., Gang E. J., Jeong J. A., Ahn C., Hwang S. H., Yang I. H., Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells // *Biochemical and biophysical research communications*. 2005. Vol. 330(4). P. 1153–1161.
  71. Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Sharkis S. J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell // *Cell*. 2001. Vol. 105(3). P. 369–377.
  72. Zhao Q., Ren H., Zhu D., Han Z. Stem/progenitor cells in liver injury repair and regeneration // *Biology of the Cell*. 2009. Vol. 101(10). P. 557–571.
  73. Zhang S., Chu W. C., Lai R. C., Lim S. K., Hui H. P., Toh W. S. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration // *Osteoarthritis and cartilage*. 2016. Vol. 24(12). P. 2135–2140.
  74. Pulavendran S., Vignesh J., Rose C. Differential antiinflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice // *Int. Immunopharmacol.* 2010. Vol. 10(4). P. 513–519.
  75. Zhao W., Li J. J., Cao D. Y., Li X., Zhang L. Y., He Y., Dou K. F. Intravenous

- injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis // *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012. Vol. 18(10). P. 1048-1058.
76. Petersen B. E., Grossbard B., Hatch H., Pi L., Deng J., Scott E. W. Mouse A–6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers // *Hepatology*. 2003. Vol. 37. P. 632–640.
  77. Schwartz R. E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Verfaillie C. M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells // *The Journal of clinical investigation*. 2002. Vol. 109(10). P. 1291-1302.
  78. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D. M., Nakano Y., Scott, E. W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion // *Nature*. 2002. Vol. 416(6880). P. 542-545.
  79. Kiassov A. P., Van Eyken P., van Pelt J. F., Depla E., Fevery J., Desmet V. J., Yap P. S. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an imMunohistochemical and morphometric study // *Differentiation*. 1995. Vol. 59. P. 253–258.
  80. Paku S., Schnur J., Nagy P., Thorgeirsson S. S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver // *Am. J. Hepatol*. 2001. Vol. 158. P. 1313–1323.
  81. Masumoto A., Yamamoto N. Cell characterization of a hepatocyte growth factor derived from nonparenchymal liver cells // *Struct. Funct*. 1993. Vol. 18(2). P. 87–94.
  82. Theise N. D., NimMakayalu M., Gardner R., Illei P. B., Morgan G., Teperman L., Krause D. S. Liver from bone marrow in humans // *Hepatology*. 2000. Vol. 32. P. 11–16.
  83. Bozhkov A. I., Klimova E. M., Nikitchenko Y. V., Davydov V.V., Zvyagintseva O. V., Kurguzova N. I., Sidorov V. I., Naglov A. V. Stem cells take part in regulation of prooxidant activity and imMunity at liver fibrosis // *American Journal of Biomedical and Life Sciences: Special Issue: Mechanisms of Protection Against Oxidative Stress*. 2014. Vol. 2(6-1). P. 5–12.

84. Alison M.R., Poulsom R., Jeffery R. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells // *Nature*. 2000. Vol. 406. P. 257-262.
85. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes // *Nature*. 2003. Vol. 422. P. 897–901.
86. Körbling M., Katz R. L., Khanna A., Ruifrok A. C., Rondon G., Albitar M., Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral blood stem cells // *New England Journal of Medicine*. 2002. Vol. 346(10). P. 738–46.
87. Оченашко О. В., Божков А. И., Петренко А. Ю. Влияние эмбриональных клеток человека на синтез ДНК и яРНК в регенерирующей печени крыс // *Укр. біохім журн.* 2002. Т. 74, №3. С. 25-30.
88. Петренко А. Ю. Стволовые клетки печени // *Проблемы криобиологии*. 2005. Т.15, № 3. С. 323-326.
89. Zhang Z. X., Zhang Z. X., Guan L. X., Zhang K., Zhang Q., Dai L. J. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury // *Cytotherapy*. 2008. Vol. 10. P. 134–139.
90. Xiang G. A., Zhang G. Q., Fang C. H., Gao P., Chen K. Y. A preliminary study of the homing capacity of allograft mesenchymal stem cells to rat liver // *Academic journal of the first medical college of PLA*. 2005. Vol. 25. P. 994–997.
91. Petersen B.E. Hepatic “stem cells”: coming full circle // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2001. Vol. 27(3). P. 590–600.
92. Fox J. M., Chamberlain G., Ashton B. A., Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking // *British journal of haematology*. 2007. Vol. 137. P. 491–502.
93. Kakinuma S., Tanaka Y., Chinzei R. et al. Human umbilical stem cell cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells // *Stem cells*. 2003. Vol. 21. P. 217–227.
94. Avital J., Inderbitzin D., Aoki T. et al. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells // *Bioch., Biophys.*

- Res. ComMunic. 2001. Vol. 288. P. 156–164.
95. Fiegel H.C., Lioznov M.V. et al. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells // *Stem cells* 2003. Vol. 21(1). P. 98–104.
  96. Zhao Y., Glesne D., Huberman E. A. human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells // *PNAS USA*. 2003. Vol. 100. P. 2426–31.
  97. Stolzing A., Jones E., McGonagle D., Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies // *Mechanisms of ageing and development*. 2008. Vol. 129(3). P. 163-173.
  98. Lee K. D., Kuo T. K. C., Whang-Peng J., Chung Y. F., Lin C. T., Chou S. H., Lee O. K. S. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells // *Hepatology*. 2004. Vol. 40. P. 1256–1259.
  99. Lange C., Bassler P., Lioznov M.V. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells // *World journal of gastroenterology: WJG*. 2005. Vol. 11. P. 4497–4504.
  100. Ong S.Y., Dai H., Leong K.W. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture // *Biomaterials*. 2006. Vol. 27. P. 4087–4097.
  101. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo // *Nat. Med*. 2000. Vol. 6. P. 1229–1234.
  102. Miyazaki M., Akiyama I., Sakaguchi M., Nakashima E., Okada M., Kataoka, K., Huh N. H. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture // *Biochemical and biophysical research comMunications*. 2002. Vol. 298. P. 24–30.
  103. Fontanellas A., Mazurier F., Landry M., Taine L., Morel C., Larou M., de Verneuil H. Reversion of hepatobiliary alterations by bone marrow transplantation in a murine model of erythropoietic protoporphyria // *Hepatology*. 2000. Vol. 32. P. 73–81.
  104. Chamberlain J., Yamagami T., Colletti E., Theise N. D., Desai J., Frias A., Almeida-Porada G. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic

- delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep // *Hepatology*. 2007. Vol. 46. P. 1935–1945.
105. Camargo F.D., Finegold M., Goodell M.A. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners // *The Journal of clinical investigation*. 2004. Vol. 113. P. 1266–1270.
  106. Willenbring H., Bailey A. S., Foster M., Akkari Y., Dorrell C., Olson S., Grompe M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver // *Nat. Med*. 2004. Vol. 10. P.774–748.
  107. Russo F. P., Alison M. R., Bigger B. W., Amofah E., Florou A., Amin F., Forbes S. J. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis // *Gastroenterology*. 2006. Vol. 130. P.1807–1821.
  108. Kordes C., Sawitza I., Müller-Marbach A., Ale-Agha N., Keitel V., Klonowski-Stumpe H., Häussinger D. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells // *Biochemical and biophysical research communications*. 2007. Vol. 352(2). P. 410–417.
  109. Gallagher K. A., Joshi A., Carson W. F., Schaller M., Allen R., Mukerjee S., Burant C. F. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes // *Diabetes*. 2015. Vol. 64. P. 1420–1430.
  110. Sacchetti B., Funari A., Michienzi S., Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment // *Cell*. 2007. Vol. 131(2). P. 324-336.
  111. Galun E., Axelrod J.H. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2002. Vol. 1592. P. 345–358.
  112. Marubashi S., Sakon M., Nagano H., Gotoh K., Hashimoto K., Kubota M., Nakamori S. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model // *Surgery*. 2004. Vol. 136. P. 1028–1037.
  113. Fausto N., Riehle K.J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications // *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2005. Vol. 12.

P. 181–189.

114. Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A. I., Shi, Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide // *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 2. P. 141–150.
115. Hay D. C., Zhao D., Fletcher J., Hewitt Z. A., McLean D., Urruticoechea-Uriquen A., Cui W. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development *in vivo* // *Stem cells*. 2008. Vol. 26(4). P. 894-902.
116. Mohamadnejad M., Namiri M., Bagheri M., Hashemi S. M., Ghanaati H., Mehrjardi N. Z., Baharvand H. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis // *World journal of gastroenterology: WJG*. 2007. Vol. 13. P. 3359–3363.
117. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Nahmias Y., Goldwasser Y., Kitagawa Y., Yarmush M. L. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1 // *Molecular Therapy*. 2010. Vol. 18 (10). P. 1857–1864.
118. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells // *Hepatology*. 2004. Vol. 39(6). P. 1477-1487.
119. Honczarenko M., Le Y. I., Swierkowski M., Ghiran I., Glodek A. M., Silberstein L. E. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors // *Stem Cells*. 2006. Vol. 24. P. 1030–1041.
120. Ohienko S.L., Bondar' A. Yu., Ivanov E. G. Induced liver fibrosis influence on the bone marrow cells culture of rats' different ages // *The development of nature sciences: problems and solutions: The international research and practical conference, 27 – 27 apr. 2018.: abstr. Brno, 2018*. P. 405-407.
121. Ohienko S., Bondar A., Ivanov E. Assessment of cytotoxic action of bovine's colostrum low-molecular-weight components on bone marrow cells' culture // *Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts: XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, 10 – 12 apr. 2018.: abstr. Lviv*,

2018. P. 267–268.

122. Ohiienko S.L., Bondar' A. Yu. Bone marrow cells behavior in the primary culture under influence of CCl<sub>4</sub> – induced liver fibrosis // Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances: XV International Scientific Conference of Students and Young Scientists, 18 – 21 apr. 2017.: abstr. Kyiv, 2017. P. 153-154.
123. Ohiienko S.L., Bondar' A. Yu., Gumennaya M. S., Marchenko V. P. Age affects the “behavior” and the sensibility to copper ion of animals’ bone marrow cells in the primary culture // Youth and progress of biology: XIII international scientific conference for students and PhD students, 25 – 27 apr. 2017.: abstr. Lviv, 2017. P. 245-246.
124. Ohiienko S.L., Bondar' A. Yu. Influence of anabaena flos-aquae extract on the bone marrow primary culture of young rats // Biology: from a molecule up to the biosphere»: 12th International young scientists’ conference, 29 nov. – 1 dec. 2017.: abstr. Kharkiv, 2017. P. 38-40.
125. Ohiienko S.L., Kuznetsova Y.A., Bondar A. Yu. Colostrum low molecular components affects the primary culture of bone marrow cells. // Shevcenkivska Vesna: Biology: XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students and Young Scientists, 6 – 8 apr. 2016.: abstr. Kyiv, 2016. P. 06–08.
126. Lee M. J., Jung J., Na K. H., Moon J. S., Lee H. J., Kim J. H., Kim G. J. Anti-fibrotic effect of chorionic plate-derived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl<sub>4</sub>-injured liver: potential application to the treatment of hepatic diseases // Journal of cellular biochemistry. 2010. Vol.111 (6). P. 1453–1463.
127. Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Isner J. M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization // Circulation research. 1999. Vol. 85. P. 221–228.
128. Lee V.M., Stoffel M. Bone marrow: an extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cells? // The Journal of clinical investigation. 2003. Vol. 111. P. 799–801.



129. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine D. M., Leri A., Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium // *Pediatric transplantation*. 2003. Vol. 7. P. 86–88.
130. Ratajczak M. Z., Kucia M., Majka M., Reca R., Ratajczak J. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells – are we spotting on the same cells from the different angles? // *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2004. Vol. 42(3). P. 139–146.
131. Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Du J. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature*. 2002. Vol. 418. P. 41–49.
132. Ganju R. K., Brubaker S. A., Meyer J., Dutt P., Yang Y., Qin S., Groopman J. E. The  $\alpha$ -chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  binds to the transmembrane G-proteincoupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. P. 23169–23175.
133. Horuk R. Chemokine receptors // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001. Vol. 12. P. 313–335.
134. Musina R.A., Egorov E.E., Beliaevskii A.V. Stem cells: properties and perspectives of therapeutic use // *Mol. Biol*. 2004. Vol. 38(4). P. 563–577.
135. Gallacher L., Murdoch B., Wu D.M. Isolation and characterization of human CD34- Lin- and CD34+Lin hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 // *Blood*. 2000. Vol. 95. P. 2813–2820.
136. Boyer M., Townsend L., Vogel L.M. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood // *J. Vasc. Surg*. 2000. Vol. 31. P. 181–189.
137. Hipp J., Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine // *Sci. China Life*. 2010. Vol. 53(1). P. 154–156.
138. Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Jiang Y. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos // *Cell Transplant*. 2003. Vol. 12. P. 201–213.

139. Shaikh A., Bhartiya D. Pluripotent stem cells in bone marrow and cord blood. In Blood cell—an overview of studies in hematology. InTech. 2002. 242 p.
140. Scott C. L., Zheng F., De Baetselier P., Martens L., Saeys Y., De Prijck S., Devoogdt N. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated kupffer cells // Nature comMunications. 2016. Vol. 7. P. 10321-103221.
141. Latimer K.S. Prasse K.W. Leukocytes // Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine. 2003. Vol. 4. P. 72-77.
142. John W. Harwey. Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow. Saunders. 2010. 368 p.
143. Koury M.J. Sawyer S.T. New insights of erythropoiesis. // Curr. Opin. Hematol. 2002. Vol. 9. P. 42-46.
144. James G. Fox. The Mouse in Biomedical Research. – 2nd edition. Volume III. Animal Medicine Series. 2007. 642 p.
145. Almeida J., Bueno C., Alguero M. C. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, imMunophenotypical and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage // Clinical ImMunol. 2001. Vol 100. P. 325–338.
146. Saretzki G, Armstrong L, Leake A, Lako M, von Zglinicki T. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells // Stem Cells. 2004. Vol. 22. P. 962-971.
147. Csete M, Walikonis J, Slawny N. Oxygenmediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture // J Cell Physiol. 2001. Vol. 189. P. 189-196.
148. Limoli CL, Rola R, Giedzinski E, Mantha S, Huang TT, Fike JR. Cell-density-dependent regulation of neural precursor cell function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004. Vol. 101. P. 16052-16057.
149. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche // Trends ImMunol. 2005. Vol. 26. P. 426- 433.
150. Piccoli C, Ria R, Scrima R. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells //

- J Biol Chem. 2005. Vol. 280. P. 26467-26476.
151. Ito K., Hirao A., Arai F., Takubo K., Matsuoka S., Miyamoto K., Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells // *Nature medicine*. 2006. Vol. 12(4). P. 446-457.
  152. Jang Y. Y., Sharkis, S. J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche // *Blood*. 2007. Vol. 110(8). P. 3056-3063
  153. Spangrude G. J., Heimfeld S., Weissman I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells // *Science*. 1988. Vol. 241. P. 58-62.
  154. Hu W., Jing P., Wang L., Zhang Y., Yong J., & Wang Y. The positive effects of Ginsenoside Rg1 upon the hematopoietic microenvironment in a D-Galactose-induced aged rat model // *BMC complementary and alternative medicine*. 2015. Vol. 15(1). P. 119-124.
  155. Bilder D., O'Brien L. E. Beyond the niche: tissue-level coordination of stem cell dynamics // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2013. Vol. 29. P 36-42.
  156. Justin V. D. Leanne J. Stem Cells and the niche: a dynamic duo // *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 6. P. 103—115.
  157. Peter S., Andrew V. The stem cell niche and its role in self-renewal, aging, and malignancy // *Stem Cells*. 2010. Vol. 9. P. 677-726.
  158. Ema H., Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. // *Blood*. 2012. Vol. 120. P. 2174-2181.
  159. Eric R. Bernhard G. et al. Attenuation of miR-126 cctivity expands HSC in vivo without exhaustion // *Cell Stem*. 2012. Vol. 10. P. 81-89.
  160. Jaclyn G. Somatic cell lineage is required for differentiation and not maintenance of germline stem cells in *Drosophila* testes // *PNAS*. 2012. Vol. 109. P. 177-181.
  161. Kiefer J. C. Primer and interviews: The dynamic stem cell niche // *Dev. Dyn*. 2011. Vol. 240. P. 737-743.
  162. Kim B. Stem cells: An ageing decline // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012. Vol. 13. P. 681-689.

163. Maria F., Guido T. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche // *Current Opinion in Cell Biology*. 2012. Vol. 24. P. 645-651.
164. Potthoff M. J., Klierer S. A. Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine // *Genes & Dev*. 2012. Vol. 26. P. 312-324.
165. Salm S. B. TGF- $\beta$  and stem cell factor regulate cell proliferation in the proximal stem cell niche // *Prostate*. 2012. Vol.72. P. 998-1005.
166. Laine S. K., Hentunen T. Do microRNAs regulate bone marrow stem cell niche physiology // *Gene*. 2012. Vol. 497. P. 11-19.
167. Parrott B., Hudson A. Control of germline stem cell division frequency-a novel, developmentally regulated role for epidermal growth factor signaling. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. P. 60-69.
168. Kaewsuwan S., Song S. Y., Kim J. H., Sung J. H. Mimicking the functional niche of adipose-derived stem cells for regenerative medicine // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012. Vol. 12. P. 175-188.
169. Lander A., Kimble J. What does the concept of the stem cell niche really mean today? // *BMC Biology*. 2012. Vol. 11. P. 10-12.
170. Nishida C. Kusubata K. et al. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells // *Blood*. 2012. Vol. 119. P. 5405-5416.
171. Norifumi U., Masuko U. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche // *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. Vol. 10. P 532-539.
172. Park J. K., Ki M. R., Lee E. M., Kim A. Y., You S. Y., Han S. Y., Rando T. A. Losartan improves adipose tissue-derived stem cell niche by inhibiting transforming growth factor- $\beta$  and fibrosis in skeletal muscle injury. // *Cell Transplant*. 2012. Vol. 33. P. 102-111.
173. Thomas L. Endothelial and perivascular cells maintain hematopoietic stem cells. // *Nature*. 2012. Vol. 481. P 457-462.
174. Liu K., Ji K., Guo L., Wu W., Lu H., Shan P., Yan C. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer // *Microvasc*

Res. 2014. Vol. 92. P. 10-18.

175. Toma J. G., Akhavan M., Fernandes K. J., Barnabe-Heider F., Sadikot A., Kaplan D. R., Miller F. D. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin // *Nat. Cell Biol.* 2001. Vol. 3. P. 778–784.
176. Council Directive on the approximation of laws, regulation and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes // *Official Journal.* 1986. N 358. P. 0001 – 0028.
177. Кундиев Ю. И. Состояние биоэтики в Украине // *Медичний Всесвіт.* 2006. Т. 11, № 1-2. С. 41–46.
178. Bozhkov A. I., Klimova O. M., Nikitchenko Y. V. Kurguzova N. I., Linkevych O. S., Lebid K. M., Protsenko O. S., Remneva N. A., Al-Bahadly A. M. M., Al-Begai M. A. Y. Ontogenetic approach to the study of mechanisms of copper-induced liver fibrosis // *Advances in Aging Research.* 2017. Vol. 6 (3). P. 39-54.
179. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Klimova E. M., Linkevych O. S., Lebid K. M., Al-Bahadli A. M. M., Alsardia M. M. A. Young and old rats have different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis // *Advances in Gerontology.* 2017. Vol. 7 (1). P. 41–50.
180. Klimova E. M., Merezhko O. S., Al-Bahadly Ali M. M., Kurguzova N. I., Bozhkov A. I. Age determines the intensity of thyrotropic hormone production in response to copper sulphate intoxication // *Advances in Biology & Earth Sciences.* 2018. Vol. 3 (3). P. 234-240.
181. Amend S., Valkenburg K., Pienta K. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation // *J. Visualized Exp.* 2016. Vol. 2016. P. 12–22.
182. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Aoyama K., Ishikawa T., Nishina H., Okita, K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice // *Hepatology.* 2004. Vol. 40 (6). P.1304-1311.
183. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V. Caloric restriction diet induces specific epigenotypes associated with life span extension // *Journal of Nutritional Therapeutics.* 2013. Vol. 2. P 30-39.

184. Amend S., Valkenburg K., Pienta K. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation // J. Visualized Exp. 2016. Vol. 2016. P. 12–22.
185. Bozhkov A., Kabachnyy V., Kolot N. et al. Hormesis effect and the influence of ultra-low glycosides doses on the bone marrow cells proliferative activity in culture // J. Harmonized Res. Pharm. 2014. Vol. 3. P. 154–166.
186. Lewandowski K., Kowalik M., Pawlaczyk R. et al. Microscopic examination of bone marrow aspirate in healthy adults - comparison of two techniques of slide preparation // Int. J. Lab. Hematol. 2012. Vol. 34. P. 254-61.
187. Bito V., Sipido K. R., Macquaide N. Basic methods for monitoring intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiac myocytes using Fluo-3 // Cold Spring Harbor protocols. 2015. Vol. 4. pdb-prot076950.
188. Lee G. A., Choi, K. C., Hwang K. A. Kaempferol, a phytoestrogen, suppressed triclosan-induced epithelial-mesenchymal transition and metastatic-related behaviors of MCF-7 breast cancer cells // Environmental toxicology and pharmacology. 2017. Vol. 49. P. 48-57.
189. Botwinick J. Aging and behavior: A comprehensive integration of research findings. New York: Springer, 2013. 439 p.
190. Gladyshev V. N. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! // Antioxidants; redox signaling. 2014. Vol. 20. P. 727-731.
191. Gravina S., Vijg J. Epigenetic factors in aging and longevity // European Journal of Physiology. 2010. Vol. 459. P. 247-258.
192. López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., & Kroemer G. The hallmarks of aging // Cell. 2013. Vol. 153. P. 1194-1217.
193. Vionnie W. C., Yusuf R. Z., Oki T., Wu J., Saez B., Wang X., Gu H. Epigenetic memory underlies cell-autonomous heterogeneous behavior of hematopoietic stem cells // Cell. 2016. Vol. 167 (5). P. 1310-1322.
194. Hamzic E., Whiting K., Gordon Smith, E., Pettengell R. Characterization of bone marrow mesenchymal stromal cells in aplastic anaemia // British journal of haematology. 2015. Vol. 169(6). P. 804-813.
195. Carlberg I., Mannerviek B. Glutathione Reductase Levels in Rat Brain // Journal

- of Biological Chemistry. 1975. Vol. 250. P. 5475-5480.
196. Freeman R. and King B. Technique for the Performance of the Nitro-Blue Tetrazolium (NBT) Test // Journal of Clinical Pathology. 1972. Vol. 25. P. 912-914.
  197. Sastre M., Ritchie C. W., Hajji N. Metal ions in Alzheimer's disease brain // JSM Alzheimer's Dis. Relat. Dement. 2015. Vol. 2. P. 242-251.
  198. Aron A. T., Ramos-Torres K. M., Cotruvo Jr J. A., Chang C. J. Recognition-and reactivity-based fluorescent probes for studying transition metal signaling in living systems // Accounts of chemical research 2015. Vol. 48(8). P. 2434-2442.
  199. Senda T., Dogra P., Granot T., Furuhashi K., Snyder M. E., Carpenter D. J., Farber D. L. Microanatomical dissection of human intestinal T-cell immunity reveals site-specific changes in gut-associated lymphoid tissues over life // Mucosal immunology. 2019. Vol. 12(2). P. 378-382.
  200. Fujii T., Fuchs B. C., Yamada S., Lauwers G. Y., Kulu Y., Goodwin J. M., ... & Tanabe K. K. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor // BMC gastroenterology. 2010. Vol. 10. P. 79-85.
  201. Bozhkov A. I., Klimova O. M., Nikitchenko Y. V., Kurguzova N. I., Linkevych O. S., Lebid K. M., Al-Begai M. A. Ontogenetic Approach to the Study of Mechanisms of Copper-Induced Liver Fibrosis // Advances in Aging Research. 2017. Vol. 6. P. 39-44.
  202. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // Stem cells. 2006. Vol. 24. P. 1294-1301.
  203. Oh J., Lee Y. D., & Wagers A. J. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities // Nature medicine. 2014. Vol. 20. P. 870-880.
  204. Cooper M. D. The early history of B cells // Nature Reviews Immunology. 2015. Vol. 15(3). P. 191-197.
  205. Mareschi K., Castiglia S., Sanavio F., Rustichelli D., Muraro M., Defedele D.,

- Fagioli F. ImMunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta // *Experimental hematology*. 2016. Vol. 44(2). P. 138-150.
206. Vitiello L., Ferraro E., De Simone S., Gatta L., Feraco A., Racioppi L., Rosano G. CXCL12 prolongs naive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes survival via activation of PKA, CREB and Bcl2 and BclXl up-regulation // *International journal of cardiology*. 2016. Vol. 224. P. 206-212.
207. O'Donnell J. A., Kennedy C. L., Pellegrini M., Nowell C. J., Zhang J. G., O'Reilly L. A., Roberts A. W. Fas regulates neutrophil lifespan during viral and bacterial infection // *Journal of leukocyte biology*. 2015. Vol. 97(2). P. 321–326.
208. Meena L., Neesah P. Colostrum - its Composition, Benefits as a Nutraceutical - A Review // *Curr Res Nutr Food Sci*. 2013. Vol. 1. P. 37-47.
209. Rathe M., Müller K., Sangild P. T., Husby S. Clinical applications of bovine colostrum therapy: a systematic review // *Nutrition Rewires*. 2014. Vol. 72. P. 237-254.
210. Bagwe S., Tharappel L. J., Kaur G., Buttar H. S. Bovine colostrum: an emerging nutraceutical // *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2015. Vol. 12. P. 175–185.
211. Conneely M., Berry D. P., Murphy J. P., Lorenz I., Doherty M. L., Kennedy, E. Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum imMunoglobulin G concentration and health status of dairy calves // *Journal of Dairy Science*. 2014. Vol. 97. P. 6991–7000.
212. Blach-Olszewska Z., Zaczynska E., Gustaw-Rothenberg K., Avila-Rodrigues M., Barreto G., Leszek J., Aliev G. The innate imMunity in Alzheimer disease-relevance to pathogenesis and therapy // *Current Pharmaceutical Design*. 2015. Vol. 21. P. 3582-3588.
213. Folch J., Petrov D., Ettcheto M., Abad S., Sánchez-López E., García M. L., Camins A. Current research therapeutic strategies for Alzheimer's disease treatment // *Neural plasticity*. 2016. Vol. 2016. P. 8501693-8501702.



214. Kochs L., Wegener S., Sühnel A., Voigt K., Zettl U. K. The use of complementary and alternative medicine in patients with multiple sclerosis: A longitudinal study // *Complementary Therapies in Medicine*. 2014. Vol. 22. P. 166–172.
215. Uto Y., Kawai T., Sasaki T., Hamada K., Yamada H., Kuchiike D., Hayakawa A. Degalactosylated/desialylated bovine colostrum induces macrophage phagocytic activity independently of inflammatory cytokine production. // *Anticancer Research* August. 2015. Vol. 35. P. 4487-4492.
216. Terato K., Do C. T., Shionoya H. Slipping through the cracks: linking low immune function and intestinal bacterial imbalance to the etiology of rheumatoid arthritis // *Autoimmune Diseases*. 2015. Vol. 2015. P. 636207-636216.
217. Conneely M., Berry D. P., Sayers R., Murphy J. P., Lorenz I., Doherty M. L., Kennedy E. Factors associated with the concentration of immunoglobulin G in the colostrum of dairy cows // *Animal*. 2013. Vol. 7. P. 1824-1832.
218. Sprent J., Tough D. F. Lymphocyte life-span and memory // *Science*. 1994. Vol. 265. P.1395-400.
219. Ratajczak M. Z, Kucia M., Majka M., Reka R., Ratajczak J. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells--are we spotting on the same cells from the different angles? // *Folia Histochem Cytobiol*. 2004. Vol. 42. P. 139-146.
220. Alaribe F. N., Mazzoni E., Rigolin G. M., Rizzotto L., Maniero S., Pancaldi C., Tognon M. G. Extended lifespan of normal human B lymphocytes experimentally infected by SV40 or transfected by SV40 large T antigen expression vector // *Leukemia Research*. 2013. Vol. 37. P. 681–689.
221. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation // *Nature Reviews Immunology*. 2013. Vol. 13. P. 159- 175.
222. Salazar-Ramiro A., Hernández-Pedro N. Y., Rangel-Lopez E., Cruz V. P. D., Estrada-Parra S. Dialyzable leukocyte extract (transfer factor) as adjuvant immunotherapy in the treatment of cancer // *MOJ Auto Dis*. 2016. Vol. 1(1). P. 226-232.
223. Wybran J., Levin A. S., Spitler L. E., Fudenberg H. H. Rosette-forming cells, immunologic deficiency diseases and transfer factor. *New England Journal of*

Medicine. 1973. Vol. 288(14). P. 710-713.

224. Geering B., Stoeckle C., Conus S., Simon H. U. Living and dying for inflamMation: neutrophils, eosinophils, basophils // Trends in immunology. 2013. Vol. 34(8). P. 398-409.

## ДОДАТОК 1

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Наукові праці у зарубіжних наукових фахових виданнях:*

1. Божков А. И., **Огиенко С. Л.**, Бондарь А. Ю., Климова Е. М., Иванов Е. Г. Фиброз печени, индуцированный у молодых и старых животных, сопровождается возрастзависимыми изменениями в клетках костного мозга // Успехи геронтологии. 2019. Т. 32, № 1-2. С. 45-54. (Перевидана в: Bozhkov A. I., **Ohiienko S. L.**, Bondar A. Yu., Klimova E. M., Ivanov E. G. Liver-induced fibrosis in young and old animals is accompanied by age-dependent changes in bone marrow cells // Advances in Gerontology. 2019. Vol. 32, N 1-2. P. 45-54. (SCOPUS, PubMed, Crossref, GoogleScholar). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*
2. **Ohiienko S. L.**, Bondar A. Yu., Ivanov E. G., Bozhkov A. I. Liver fibrosis has a different effect on the “lifespan” of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats // MOJ Gerontol Ger. 2019. Vol. 4. N 1. P. 36–40. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*
3. **Ohiienko S. L.**, Bozhkov A. I., Bondar A. Yu., Ivanov E. G., Ionov I. A. Bone marrow cells obtained from old animals differ from the young animals cells in their ability to divide and in response to the presence of liver fibrosis in primary culture // Advances in Aging Research. 2019. Vol. 8. P. 14-27. (Crossref, GoogleScholar). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*
4. Bozhkov A. I., **Ohiienko S. L.**, Kuznetsova Y. A., Bondar A. Y., Marchenko V. P., Gumennaya M. S. Donor age affects behavior and sensibility of bone marrow cells to copper ions in primary culture // Advances in Gerontology. 2017. Vol.

7, № 4. Р. 336-344. (SCOPUS, PubMed, Crossref, GoogleScholar). (Перевидана в: Божков А. И., **Огиенко С. Л.**, Кузнецова Ю. А., Бондарь А. Ю., Марченко В. П., Гуменная М. С. Возраст донора влияет на «поведение» и чувствительность клеток костного мозга к ионам меди в первичной культуре // Успехи геронтологии. 2017. Т. 30, № 3. С. 457-467). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

5. Anatoliy I. Bozhkov, Eugeniya G. Ivanov, Yuliya A. Kuznetsova, **Svetlana L. Ohienko**, Anastasiya Yu. Bondar. Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture // Frontiers in Biology. 2017. Vol. 12, N 4. P. 271-279. (SCOPUS, Crossref, GoogleScholar) *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

*Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації*

6. **Ohienko S. L.**, Bondar' A. Yu., Ivanov E. G. Induced liver fibrosis influence on the bone marrow cells culture of rats' different ages // The development of nature sciences: problems and solutions : The international research and practical conference, 12 – 18 sept. 2018. : abstr. Brno, 2018. P. 405. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

7. **Ohienko S.**, Bondar A., Ivanov E. Assessment of cytotoxic action of bovine's colostrum low-molecular-weight components on bone marrow cells' culture // Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts : XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, 10 – 12 apr. 2018. : abstr. Lviv, 2018. P. 267-268. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів,*

написання тез).

8. **Ohienko S. L.**, Bondar' A. Yu. Bone marrow cells behavior in the primary culture under influence of CCl<sub>4</sub> – induced liver fibrosis // Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances : XV International Scientific Conference of Students and Young Scientists, 18 – 21 apr. 2017. : abstr. Kyiv, 2017. P. 153-154. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

9. **Ohienko S. L.**, Bondar' A. Yu., Gumennaya M. S., Marchenko V. P. Age affects the “behavior” and the sensibility to copper ion of animals’ bone marrow cells in the primary culture // Youth and progress of biology : XIII international scientific conference for students and PhD students, 25 – 27 apr. 2017. : abstr. Lviv, 2017. P. 245-246. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

10. **Ohienko S. L.**, Bondar' A. Yu. Influence of anabaena flos-aquae extract on the bone marrow primary culture of young rats // Biology: from a molecule up to the biosphere : 12th International young scientists’ conference, 29 nov. – 1 dec. 2017. : abstr. Kharkiv, 2017. P. 38. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

11. **Ohienko S. L.**, Kuznetsova Y. A., Bondar A. Yu. Colostrum low molecular components affects the primary culture of bone marrow cells. // Shevchenkivska Vesna: Biology : XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students and Young Scientists, 6 – 8 apr. 2016. : abstr. Kyiv, 2016. P. 06-08. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез).*

## ДОДАТОК 2

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з навчальної та інноваційної  
роботи Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна

  
М. О. Азаренков

## АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи Огієнко Світлани Леонідівни «Вік – залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за різних функціональних станів печінки» у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Комісія у складі завідувача кафедри молекулярної біології та біотехнології, професора, доктора біологічних наук Божкова А. І., заступника декана з навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Волкової Н. Є. та голови методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертації Огієнко Світлани Леонідівни, а саме: взаємозв'язок характеристик кісткового мозку у первинній культурі з віком тварин та функціональним станом печінки впроваджені у навчальний процес на біологічному факультеті при розробці практичних робіт зі спеціального курсу «Клітинні технології» для студентів біологічного факультету, які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні освіти кафедри молекулярної біології та біотехнології національного університету імені В. Н. Каразіна.

Завідувач кафедри  
молекулярної біології та  
біотехнології,  
д.б.н., професор



А. І. Божков

Заступник декана з навчальної  
роботи, к.б.н., доцент



Н. Є. Волкова

Голова методичної комісії  
біологічного факультету,  
к.б.н., доцент



В. В. Мартиненко



## ДОДАТОК 3

## Акт впровадження

Харківський національний  
університет ім. В.Н. Каразіна  
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4  
Р/р 31259229101533 в ДКСУ  
МФО 820172  
Код ЄДРПОУ 02071205

Фермерське господарство «Альфа»  
62210, Харківська обл., Золочівський район,  
с. Одноробівка, вул. Тіткова, 60  
Р/р 26007121366 в Райффайзен Банк «Аваль»,  
м. Київ  
МФО 380805  
Код ЄДРПОУ 21235629  
Свідоцтво платника ПДВ № 200150317  
ІПН 212356220139

## АКТ ПРИЙМАННЯ-ЗДАЧІ

19 лютого 2019

Ми, що підписалися нижче, представник *виконавця* в особі проректора з наукової роботи Катрича В.О., з одного боку, і представник *замовника* в особі голови господарства Белінського В.І., з другого боку, склали цей акт про те, що згідно з договором № 05-18 від 01 лютого 2018 р. «Дослідження дозової залежності дії компонентів молозива на тест-об'єкти та характеристику редокс-системи організму» виконавцем виконано робіт на 190 000,00 грн. (Сто дев'яносто тисяч), в т.ч. ПДВ – 31 666,67 грн.

Всього на суму, гривень – 190 000,00 грн. в т.ч. ПДВ 31 666,67,00 грн.  
Належить одержати за цим актом гривень – 0,00 грн.

Від виконавця акт підписав:  
Проректор з наукової роботи  
ХНУ імені В.Н. Каразіна



В.О. Катрич

Від замовника акт підписав:  
Голова фермерського господарства  
«Альфа»



В.І. Белінський